СОВРЕМЕННАЯ
ТЕХНОЛОГИЯ

В. А. Смирнов

ПИЩЕВЫЕ КИСЛОТЫ

Лимонная,
молочная,
винная

МОСКВА
«ЛЕГКАЯ И ПИЩЕВАЯ
ПРОМЫШЛЕННОСТЬ»
1983

ББК 36.87
С 50
УДК 661.733.2/.3+661.734.1

Смирнов В. А. Пищевые кислоты (лимонная, молочная, винная). М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1983, с.264.

В книге изложены микробиологические, биохимические и физико-химические основы производства лимонной, молочной и винной кислот. Обобщены важнейшие научные публикации и патентные материалы. Описаны основные технологические процессы и оборудование производства кислот, приведены технико-экономические показатели. Описаны способы утилизации отходов и дана характеристика сточных вод. Показано использование пищевых кислот.

Для инженерно-технических работников пищевой промышленности
Таблиц 43. Иллюстраций 67. Список литературы — 115 названий.

Рецензенты: д-р техн. наук В. Л. Яровенко и инж. Г. А. Хрычев

Валентин Александрович Смирнов

ПИЩЕВЫЕ КИСЛОТЫ
(лимонная, молочная, винная)

Редактор А. И. Ковалевская
Художественный редактор В. А. Чуракова
Технический редактор Г. А. Алавина
Корректоры Е. А. Постникова и О. И. Галанова

ИБ № 1185

Сдано в набор 18.08.82. Подписано в печать 23.05.83 Т—11041
Формат 60×90¹/₁₆ Бумага типографская № 2 Литературная гарнитура Высокая печать. Объем 16,5 п л Усл. п. л 16,5
Усл. кр.-отт. 16,75. Уч.-изд. л. 19,45 Тираж 2800 экз.
Заказ 1816. Цена 1 р. 10 к.

Издательство «Легкая и пищевая промышленность»,
113035, Москва, М-35, 1-й Кадашевский пер., д. 12.

Московская типография № 6 Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли,
109088, Москва, Ж-88, Южнопортовая ул., 24.

С $\frac{2908000000—020}{044(01)—83}$ 20—83

ПРЕДИСЛОВИЕ

Цитрусовые плоды, виноград, кисломолочные продукты человек использует в питании с древнейших времен. После того как в XVIII в. шведский химик и фармацевт Карл Вильгельм Шееле открыл в лимонах, осадке вина (винном камне) и скисшем молоке соответственно лимонную, винную и молочную кислоты, а позже было создано промышленное производство их, эти кислоты стали вводить в пищу для придания ей кислого вкуса. Таким образом, практика добавления кислот в пищевые продукты исходит из существования натуральных кислых продуктов, а сами тривиальные названия кислот этимологически связаны с ними.

Известно много природных органических кислот, но преимущественное применение при изготовлении пищевых продуктов получили указанные выше и уксусная кислота. Пищевую уксусную кислоту производит лесохимическая промышленность, в которой она является одним из продуктов пиролиза древесины. Значительное распространение нашел пищевой уксус, получаемый окислением этилового спирта-сырца, виноматериалов и сахарсодержащих отходов консервирования (предварительно сброженных дрожжами в спирт). Учитывая специфичность производства уксусной кислоты и уксуса, в данной книге они не рассматриваются.

Последняя книга по производству пищевых кислот (коллектив авторов под ред. Е. И. Журавлевой) издана в 1953 г. и давно стала библиографической редкостью. Между тем за истекшее время произошли существенные изменения в технологии, производство сложилось в самостоятельную ветвь пищевой промышленности со своими традициями.

Современная технология все дальше уходит от описательной науки к точной, призванной выявить зависимости между частными параметрами отдельных процессов и целого, обобщить их в виде математической модели с использованием электронновычислительной техники. Достигается это проведением глубоких теоретических и экспериментальных исследований, производственной проверки. Однако состояние данной работы в области пищевых кислот сегодня, особенно в биохимической и биоинженерной части еще не достигло такого уровня.

В производстве пищевых кислот нет и устоявшейся научно-технической терминологии, поэтому она принята общей для технологии продуктов, основанной на жизнедеятельности микроорганизмов. Применительно к микробному образованию лимонной кислоты введен более точный термин — ферментация, для образования молочной кислоты сохранен традиционный термин — брожение.

В книге изложено только основное технологическое оборудование и в таком объеме, чтобы читатель мог составить общее представление об его устройстве и действии. Технологические схемы даны упрощенными, принципиальными.

Учитывая ограниченность объема книги, в список литературы включены лишь наиболее важные новые специальные источники и опущены широко известные монографии по общим вопросам, а также многочисленные патенты и авторские свидетельства.

Неоценимую помощь в подборе и переводе иностранных материалов оказали сотрудники патентно-информационного отдела Ленинградского научно-исследовательского института пищевой промышленности М. Н. Васильева и Т. А. Иовлева, которым автор выражает свою благодарность.

ЧАСТЬ

1

ВВОДНАЯ

Глава 1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ПРОИЗВОДСТВЕ ПИЩЕВЫХ КИСЛОТ

ПРОИЗВОДСТВО ПИЩЕВЫХ КИСЛОТ В СССР

Лимонная кислота в дореволюционной России начала вырабатываться в 1913 г., когда на одесских заводах виннокаменной кислоты было получено около 100 т ее из экспортного цитрата кальция. До этого небольшое количество лимонной кислоты импортировалось и одновременно ежегодно ввозилось до 50 тыс. т лимонов. В 1914 г. в связи с начавшейся мировой войной заводы лишились сырьевой базы для производства не только лимонной, но и винной кислоты, и вынуждены были закрыться.

СССР в течение первых лет также импортировал лимонную кислоту. В 1927—1930 гг. импорт составлял 60—150 т в год, а в 1934 г. был полностью прекращен. При изготовлении кондитерских изделий и напитков применяли исключительно молочную кислоту, которую вырабатывали сбраживанием углеводов. Первые попытки возобновить производство лимонной кислоты экстрагированием из растительного сырья и ферментацией сахара относятся к началу тридцатых годов.

Так, в 1934 г. на никотиновом заводе в г. Бабушкине (Московская область) на камеральной установке была проверена разработанная А. А. Шмуком технология лимонной кислоты из отборного махорочного листа, содержащего 6—8 % лимонной и 3—4 % яблочной кислот. Обе кислоты экстрагировали водой, подкисленной серной кислотой, а затем по довольно сложной химической технологии выделяли каждую из них. В 1940 г. на этом заводе был построен опытный цех, который в том же году выработал около 56 т лимонной кислоты. Начавшаяся Великая Отечественная война прервала производство, оно возобновилось в 1950 г., но продолжалось лишь до 1956 г.

Химическим институтом АН УзССР и Институтом биохимии АН СССР им. А. Н. Баха в качестве сырья были предложены листья хлопчатника и отходы (потерть) первичной переработки хлопка-сырца на хлопкоочистительных заводах. Сырье содержало примерно столько же лимонной и яблочной кислот, как и махорочный лист. Технология, в принципе аналогичная изложенной выше, в 1956 г. апробирована в том же опытном цехе никотино-

вого завода. В 1960 г. было выработано 137 т лимонной кислоты, в 1961 г. цех закрыли.

В 1946 г. в г. Баку был организован небольшой цех по производству лимонной кислоты из плодов дикорастущих гранатов, сок которых содержит до 9 % этой кислоты. В 1960 г. было выработано 23 т лимонной кислоты; в 1961 г. производство постигла та же участь, что и из двух предыдущих видов сырья.

То, что этим производствам не суждено было сохраниться, объясняется многими причинами: ограниченностью сырьевой базы дикорастущих гранатов и сезонностью производства (выработка не более 30 т лимонной кислоты в год); небольшой площадью плантаций, занятых под махорочным листом, и резким повышением закупочных цен на него; трудностью сбора листьев хлопчатника и другими причинами. К тому же к этому времени развилось ферментативное производство лимонной кислоты из мелассы, которое давало более дешевый продукт: в десять раз по сравнению с махорочным листом, в пять раз с хлопковой потертью и дикорастущим гранатом.

Возможность получения лимонной кислоты путем культивирования микроскопических грибов на сахарных питательных средах открыта немецким ботаником К. Вемером в 1893 г. и с 20-х годов текущего века ее технология начала интенсивно разрабатываться как в СССР, так и за рубежом. В 1916 г. В. Л. Омелянский впервые исследовал образование лимонной кислоты из сахара при культивировании микроскопических грибов и указал на перспективность организации производства. Исследования были продолжены А. Ф. Лебедевым, Г. Васильевым, С. И. Кузнецовым, С. П. Костычевым и В. С. Буткевичем.

На основании работ двух последних исследователей, выполненных в 1922—1930 гг. в Центральном научно-исследовательском биохимическом институте пищевой и вкусовой промышленности Наркомснаба СССР, в 1932 г. на территории 2-й Ленинградской кондитерской фабрики создана опытная установка по получению лимонной кислоты из сахара (сахарозы) способом поверхностной ферментации Aspergillus niger; в 1935 г. там же введен в эксплуатацию первый завод по производству лимонной кислоты. В 1936 г. выработано 51,6 т лимонной кислоты. В 1956 г. вместо сахара стали использовать свекловичную мелассу, что повысило производительность завода и снизило себестоимость 1 т кислоты на 40 %.

В послевоенный период ферментативное производство лимонной кислоты на мелассных средах планомерно развивалось. Вслед за Ленинградским заводом вступили в строй еще ряд заводов.

В 1957 г. Ленинградский завод ввел в строй первый цех глубинной ферментации. Постепенно переходят на глубинный способ и остальные заводы. Запланировано строительство ряда новых предприятий.

В развитии и совершенствовании отечественного производства лимонной кислоты большую роль сыграли сотрудники Всесоюзного научно-исследовательского института кондитерской промышленности — ВНИИКП (Г. И. Журавский, О. Ф. Терентьева, Е. И. Журавлева, Р. Я. Карклинь, Е. Я. Щербакова, А. А. Румба, М. И. Мартынов), работники промышленности (А. Н. Шкопоров, В. А. Девятков, М. И. Елисеев, О. П. Протодьяконов, Ю. Д. Бережной, Л. А. Новикова, Т. И. Шушкевич, В. Ф. Федосеев, В. Б. Кохановский, А. А. Луриньш, И. Г. Гома, О. М. Кандель, М. Н. Максименюк и др.).

В последние 15 лет в обновление технологии и техники производства лимонной кислоты существенный вклад внесен Ленинградским научно-исследовательским институтом пищевой промышленности — ЛНИИПП и Харьковским проектно-конструкторским и технологическим институтом — ХПКТИ.

Молочная кислота впервые была получена в 1923 г. на химико-фармацевтическом заводе им. Л. Я. Карпова в Москве по ферментативному способу, предложенному В. Н. Шапошниковым и А. Я. Мантейфель. В 1928 г. организовано производство также в Москве на Хамовническом заводе «Пищепродукт». В последующие годы появился ряд новых предприятий местной промышленности, преимущественно мелких, производительностью по 60—150 т 40%-ной молочной кислоты в год. Относительно крупные цехи были построены в 1932 г. на Минской бисквитной фабрике и в 1936 г. — на Зудубровском заводе по производству сухого крахмала.

Долгое время сырьем для производства молочной кислоты служил картофельный крахмал, который осахаривали серной кислотой или ферментами пивоваренного солода, кислоту нейтрализовали мелом и сбраживали молочнокислыми бактериями Lactobacillus delbrückii. Сейчас перерабатывают свекловичную мелассу, рафинадную патоку и импортный тростниковый сахар-сырец. Так как оптовая цена на молочную кислоту примерно в 8 раз ниже, чем на лимонную, и в 5 раз ниже, чем на винную, при полной взаимозаменяемости во многих продуктах, то при данной конъюнктуре цен производство молочной кислоты может получить предпочтительное развитие.

Разработку технологии молочной кислоты в свое время вели сотрудники Центральной научно-исследовательской лаборатории Наркомпищепрома РСФСР (А. А. Нечаева, А. А. Преображенский, К. И. Зыкова, В. С. Венгеровский, И. П. Захаров), Всесоюзного научно-исследовательского института пивоваренной промышленности (Г. С. Захарова, Г. Н. Силин), Украинского научно-исследовательского института пищевой промышленности (И. С. Орлинский), Белорусского научно-исследовательского института по производству продовольственных товаров — БНИИППТ (В. Г. Свирида, Е. Л. Клячкина), ВНИИКП (Е. И. Журавлева, П. И. Калугин). С 1965 г. исследования и разработки сосредоточены в ЛНИИПП.

Винная кислота[1] до конца прошлого века в России не вырабатывалась, и потребность в ней удовлетворялась за счет импорта. В 1890—1900 гг. построены два завода в Одессе и один в Риге. В 1908 г. в Одессе начал работать третий завод; рижский завод закрыт. В 1913 г. одесскими заводами было произведено 1900 т винной кислоты и порошка гидротартрата калия.

Сырьем для производства винной кислоты служил винный камень — отход виноделия, который привозили главным образом из Франции и частично из Италии и Греции. Использование других видов сырья, в частности, виннокислой извести, сушеных винных дрожжей, считалось экономически невыгодным. В 1914 г. прекратился импорт сырья, попытки организовать сбор отечественного сырья успеха не имели, и в 1915 г. заводы прекратили работу, а во время интервенции подверглись полному разрушению.

В 1926 г. трест «Химуголь» Наркомхимпрома СССР приступил к восстановлению одного из заводов, причем бо́льшая часть оборудования была самодельной и лишь затем постепенно заменялась современным. Сырьем для производства по-прежнему являлся винный камень, который приобретали во Франции. В 1927 г. были начаты работы по созданию собственной сырьевой базы. В настоящее время в качестве сырья используют виннокислую известь и винный камень.

Синтетическую винную (виноградную) кислоту выпускает Ереванский завод химических реактивов.

Большая заслуга в создании производства винной кислоты из побочных продуктов виноделия принадлежит старейшему работнику этой отрасли А. А. Вулихману, написавшему и первые обстоятельные руководства по организации сырьевой базы и технологии.

Яблочная кислота в 1954—1961 гг. вырабатывалась Харьковским заводом пищевых кислот методом химического синтеза: парофазным каталитическим окислением бензола в малеиновый ангидрид, растворением его в воде и контактной гидратацией малеиновой кислоты. В 1961 г. было выпущено 150 т кислоты.

ПРОИЗВОДСТВО ПИЩЕВЫХ КИСЛОТ ЗА РУБЕЖОМ

Лимонную кислоту из растительного сырья за рубежом вырабатывают с середины XIX в., т. е. примерно на 75 лет позже ее открытия К. В. Шееле (1784 г.) в соке недозрелых лимонов. С тех пор объемы производства лимонной кислоты неуклонно увеличивались и особенно быстро с 30-х годов XX в. в связи с освоением ферментативного способа.

По некоторым оценкам [85] мировое производство лимонной кислоты из различных видов сырья в 1978 г. составляло около

---

[1] Сведения об истории отечественного производства винной кислоты любезно предоставлены А. А. Вулихманом.

400 тыс. т при установленных мощностях свыше 550 тыс. т. Заводы лимонной кислоты имеются более чем в 35 странах.

Как видно из данных табл 1, наибольшее количество кислоты — около 155 тыс т — вырабатывается в США. В этой стране первоначально лимонную кислоту производили из импортного цитрата кальция, а затем из отходов калифорнийских лимонов и ананасов. В 1923 г. фирма «Charles Pfizer, Inc.» построила в Нью-Йорке первый завод по производству лимонной кислоты из сахара (сахарозы) способом ферментации.

Таблица 1

Мощности по производству лимонной кислоты

Страна	Тыс. т	Страна	Тыс. т
Австралия	3,0	Колумбия	5,0
Австрия	13,0	Мексика	13,0
Англия	34,0	НРБ	1,2
Аргентина	2,0	ПНР	1,2
Бельгия	50,0	Пуэрто-Рико	10,0
Бразилия	9,0	СРР	1,5
Дания	6,0	СФРЮ	3,0
Греция	2,5	США	154,5
Израиль	7,5	Турция	3,5
Индия	4,5	ФРГ	35,0
Индонезия	3,0	Франция	16,5
Ирландия	15,0	Чили	1,0
Испания	3,5	ЧССР	12,0
Италия	83,9	ЮАР	2,4
Канада	10,0	Япония	10,7

В 1980 г. в США лимонную кислоту из мелассы производили две фирмы — уже упомянутая «Ch. Pfizer» и «Miles Laboratories, Inc» Первая фирма вырабатывает внутри страны 97,5 тыс. т и на своих предприятиях в Ирландии, Канаде, Дании, Аргентине, Нигерии и на Тайване еще 38 тыс. т; вторая фирма — 56 тыс. т и на акционерных предприятиях в Бразилии, Мексике, Колумбии и Израиле 31 тыс т. Эти компании имеют филиалы и в других странах. Производство лимонной кислоты в США в 1983 г. достигнет 180 тыс. т [79]

Вторым крупным производителем лимонной кислоты является Бельгия (с 1977 г. производство контролируется швейцарской фирмой «Hoffmann La Rosh»).

В ФРГ лимонную кислоту выпускают фирмы «John A Benckiser» (28 тыс. т) и «C. H. Boehringer Sohn» (7 тыс. т). Первая из них является основным акционером завода в Нидерландах, вторая — завода в Англии, принадлежащего фирме «John & E. Sturge, Ltd.» (17 тыс. т). В Англии производством лимонной кислоты занимается и фирма «Ch. Pfizer».

Во Франции работают два завода, самый крупный из которых (15 тыс. т) является собственностью фирмы "Melle—Bezons S. A"; второй завод — фирмы "Lesaffr Frer" (около 1 тыс. т).

В Австрии лимонная кислота выпускается "A. G. Jungbunzlauer Spiritus- und Chemische Fabrik".

Италия — первая страна, которая с середины XIX в. начала производить цитрат кальция из сока малоценных лимонов и почти полностью экспортировала его в США, Англию, Бельгию, Германию и другие страны. В то же время Италия сама ввозила лимонную кислоту и лишь в 1913 г. экспорт превысил импорт. Производство лимонной кислоты ферментативным способом в Италии началось с 1960 г. после приобретения фирмой «Biacor» лицензии у «John

& E. Sturge, Ltd.» и постройки завода. В настоящее время указанная английская фирма является основным хозяином завода, вырабатывающего около 20 тыс. т кислоты в год. Лимонную кислоту производят также фирмы «Noury & Van Der Lande», «Liquichimica», «Chemica Arenella» и др. Производственная мощность заводов Италии, приведенная в табл. 1, в значительной мере не реализуется, так как завод фирмы «Liquchimica», построенный в 1977 г и рассчитанный на переработку н-парафинов и выпуск 53 тыс. т лимонной кислоты и ее производных, по ряду причин функционирует лишь частично [79].

В Японии вырабатывается около 6 тыс. т лимонной кислоты, в основном из бельгийского цитрата и около 5 % — микробным синтезом из отходов производства крахмала и отрубей риса (фирмы «Kausu kako» — 4 тыс т и «Sinkamimura Kem» — 1,5 тыс. т). В последние годы в Японии построены два завода лимонной кислоты, использующие в качестве сырья н-парафины. Один из заводов принадлежит американской фирме «Ch. Pfizer», другой — японской фирме «Iveta kagaku», суммарной мощностью около 10 тыс. т. Однако фирмы считают преждевременным использование этой кислоты в пищевых целях, мотивируя большой предубежденностью против нее населения и опасением неблагоприятного воздействия на производство лимонной кислоты из мелассы

Совсем недавно производство лимонной кислоты ферментативным способом в небольших масштабах организовано в Греции и Индии. В 1979 г. зависящая от «John & E. Sturge, Ltd.» фирма «Sturgia Biochemicals» построила в Индии завод производительностью 3 тыс. т кислоты в год. Индия поставила перед собой задачу — в ближайшее десятилетие стать основным производителем лимонной кислоты в Азии.

В социалистических странах, кроме СССР, лимонную кислоту вырабатывают ЧССР, НРБ, ПНР, СРР, СФРЮ. В ЧССР производство лимонной кислоты начато в 1930 г. по способу микробного синтеза, разработанному Сичом (профессором Пльзеньского университета) на заводе «Montan Industrialwerke», теперь химическом комбинате им. Ю. Фучика, входящем в объединение «Lachema» (Лабораторные химические материалы). Наряду с этим заводом в 1964 г. производство лимониой кислоты организовано на заводе по выпуску продуктов брожения в Леопольдове, входящем в управление «LIKO». В НРБ с 1965 г. лимонную кислоту вырабатывает цех при сахарном заводе им. Д. Благоева в г. Русе. В ПНР производство лимонной кислоты возникло в 1950-х годах на химическом заводе в Радохе. Сейчас лимонная кислота вырабатывается на сахарном заводе в Рациборже, на заводе местной промышленности в Зжерже и на новом заводе в Пельплине. В СРР лимонная кислота вырабатывается с 1974 г. на заводе, построенном чехословацким объединением «Lachema».

В СФРЮ имеется одно предприятие в Илирской Бистрице, построенное в 1956 г. и производящее лимонную, молочную и винную кислоты. Объем выработки лимонной кислоты — около 3 тыс. т. Швейцарская «Processing Engineering Company», принадлежащая объединению «Hemap», строит в СФРЮ промышленный комплекс по производству лимонной кислоты и аминокислот. На этом предприятии должно выпускаться ежегодно 7,5 тыс. т лимонной кислоты [79].

Кроме стран, перечисленных в табл. 1, производство лимонной кислоты зарегистрировано в Пакистане, на Филиппинах и в некоторых других странах.

Молочная кислота была открыта К. В. Шееле в 1780 г., но ее ферментативное производство началось только в 1881 г. Первый завод был построен в США. В данное время крупными производителями молочной кислоты являются фирмы «American Maize Product Co.», «Clinton Corn-Process Co» и «E. D. Du Pont». В Европе молочную кислоту начали вырабатывать в Англии с 20-х годов текущего века на заводе фирмы «Bawmans chemicals, Ltd». [100]. Производство молочной кислоты существует в Голландии, Испании, СФРЮ, ЧССР, ПНР и других странах.

Кроме ферментативной молочной кислоты в Японии, США и Англии вырабатывается синтетическая, на долю которой приходится около половины общего объема производства молочной кислоты в мире (25 тыс. т в год) [87].

Винная кислота, открытая К. В. Шееле в 1769 г., в промышленном масштабе выпускается за рубежом с 1823 г. и производство ее сосредоточено

главным образом в странах с развитым виноделием (*Италия, Франция, Испания* и некоторые другие). Винная кислота вырабатывается также в Австрии, ФРГ, в социалистических странах — НРБ, СРР, СФРЮ, ЧССР, ВНР.

Некоторое количество винной (виноградной) кислоты в ЮАР получается по химическому способу. С 1976 г. японская фирма «Toray Industries, Inc.» вырабатывает около 3 тыс. т винной кислоты способом ферментации.

Общий объем мирового производства винной кислоты не превышает 20 тыс. т в год [87].

ОСНОВНЫЕ СПОСОБЫ ПРОИЗВОДСТВА И СЫРЬЕ

Общепризнано, что производство лимонной кислоты химическими способами экономически нецелесообразно: стоимость сырья значительно выше стоимости мелассы; технология многостадийна, требует применения сильно токсичных реагентов (циановодорода, хлора и др.) и дает относительно низкий выход целевого продукта. Поэтому не удивительно, что, несмотря на большой прогресс в области химического синтеза различных органических соединений, такие сравнительно простые вещества, как лимонная, молочная и некоторые другие кислоты, до сих пор вырабатывают все еще из сахарсодержащего сырья с помощью микроорганизмов. Преимущество микробного способа заключается в последовательном ферментативном осуществлении в клетке даже значительно большего числа химических реакций в одну производственную стадию — ферментацию. Это упрощает технологию, увеличивает выход кислот и снижает их себестоимость.

В качестве сырья для ферментативного получения лимонной кислоты в большинстве стран используют мелассу — побочный продукт производства сахара из сахарной свеклы или сахарного тростника.

В США «Miles Laboratories, Inc.» перерабатывает глюкозные сиропы, получаемые ферментативным гидролизом кукурузного крахмала, во Франции завод фирмы «Melle — Bezons» — кристаллический сахар (сахарозу). Исследована возможность применения и других видов сырья. Еще в начале века В. С. Буткевич показал, что лимонная кислота может образовываться при культивировании Asp. niger на растворах уксусной кислоты, ацетатов, метилового и этилового спирта как единственных источниках углерода. Позднее другими исследователями предложены н-парафины, а в качестве продуцента — дрожжи рода Candida.

В расчете на дешевую арабскую нефть в ряде стран большая надежда возлагалась на н-парафины — один из продуктов ее переработки. Однако ввиду истощения запасов и повышения цен на нефть, относительно небольшого выхода парафинов и необходимости их использования в других направлениях они вскоре перестали быть перспективным сырьем. Синтетические спирты и уксусную кислоту получают на основе переработки попутных газов нефти и собственно природных газов; источники их не безграничны, к тому же эти виды сырья, как и н-парафины, широко используются во многих отраслях народного хозяйства. При ферментации парафинов, спиртов и уксусной кислоты дрожжами одно-

временно с лимонной кислотой в значительных количествах образуется изолимонная, чем снижается выход целевого продукта и возникает дополнительная проблема их разделения.

Как источники сырья гораздо надежнее и дешевле побочные продукты переработки растительного сырья, ежегодно возобновляемого в больших количествах. Это относится прежде всего к сахароносам (сахарная свекла и сахарный тростник), дающим сахарный сок, или, при переработке его на кристаллический сахар, мелассу, и в некоторой мере — к крахмалоносам (кукуруза, картофель), к растительным отходам сельского хозяйства и механической переработки древесины.

Путем кислотной обработки древесной щепы, опилок, стружки, соломы, стержней кукурузных початков, хлопковой шелухи и подсолнечной лузги получают гидролизаты, которые содержат сахара.

Выше было сказано, что молочная кислота вырабатывается ферментативным и химическим способами. Так как молекула ее менее сложна, чем лимонной кислоты, то при химическом синтезе число стадий меньше, а получаемый продукт имеет высокую чистоту (бесцветен и почти не содержит примесей). Из химических методов в США и Англии применяют циангидриновый, точнее — используют продукт циангидринового синтеза в производстве искусственных волокон (подробнее см. с. 24), во Франции испытано получение молочной кислоты окислением пропилена оксидом азота.

В ферментативных способах получения молочной кислоты в качестве сырья на отдельных зарубежных заводах, кроме мелассы, рафинадной патоки и сахара-сырца, пользуются кристаллической сахарозой (ПНР) и глюкозными сиропами (США). Давно разработан способ ферментации молочной сыворотки (жидкого побочного продукта производства творога, сыра, брынзы, казеина), содержащей лактозу. Производство молочной кислоты из сыворотки в СССР не организовано.

Для производства молочной кислоты могут быть использованы сок сахарной свеклы и сахарного тростника, сахарат кальция (полупродукт при извлечении сахара из мелассы), осахаренные кислотой или ферментами отходы крахмального производства, гексозные гидролизаты древесины и растительных отходов сельского хозяйства.

Запатентованы способы производства молочной кислоты из других источников углерода — побочных продуктов нефтехимической промышленности ферментацией Bacillus brevis, из гликолей (1,2-пропандиола, 1,3-бутандиола) путем культивирования Nocardia lactofacius, Arthrobacter oxydans, Alkaligenes faecalis и Fusarium solani в аэробных условиях.

Наряду с натуральной винной кислотой, извлекаемой из побочных продуктов виноделия (винного камня, винных дрожжей, виноградных выжимок, меловых осадков, винасса — коньячной барды, в которых она содержится главным образом в виде солей), в

СССР и ЮАР вырабатывают виноградную кислоту каталитическим гидроксилированием малеиновой или фумаровой кислоты пероксидом водорода. L-Винную кислоту можно получать из цис-эпоксиянтарной кислоты путем культивирования микроорганизмов, относящихся к различным таксономическим группам и содержащих индуцированную гидролазу цис-эпоксиянтарной кислоты, осуществляющую асимметрический гидролиз и разрыв кольца эпоксигруппы.

Запатентован способ получения винных кислот ферментацией сахара иммобилизованными бактериями Gluconobacter suboxydans, G. scleroides, Pseudomonas fluorescens и др. в аэробных условиях. В качестве промежуточного продукта образуется 5-кето-глюконовая кислота. D- и L-винные кислоты можно получать также окислением сахара азотной кислотой или пероксидами в присутствии фермента оксидазы как катализатора реакции. При этом наряду с винной кислотой образуются щавелевая, сахарная и другие органические кислоты.

ПРИНЦИПИАЛЬНЫЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СХЕМЫ И ЗАДАЧИ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ПРОИЗВОДСТВА

Производство лимонной кислоты

Независимо от способов и вариантов приготовления сахарных и мелассных питательных сред, ферментации, выделения лимонной кислоты, очистки ее растворов и других процессов можно записать следующую общую принципиальную технологическую схему.

Подготовка питательной среды для культивирования микроорганизма — продуцента лимонной кислоты, обычно специального штамма микроскопического гриба Asp. niger, состоит в приготовлении раствора сырья определенной концентрации (считая по сахару) и добавлении в него источников азота, фосфора и в микроколичествах других элементов, необходимых для жизнедеятельности микроорганизмов. С целью оптимизации состава питательной среды в мелассных растворах предварительно осаждают соли тяжелых металлов (железо, марганец и др.) гексацианоферроатом калия (ГЦФК, или желтой кровяной солью). Начальная величина pH готовой питательной среды устанавливается добавлением кислоты или щелочи. За рубежом при ферментации более концентрированных сред их сначала очищают катионированием. К подготовке питательной среды относится также ее стерилизация и охлаждение до температуры, оптимальной для ферментации.

Известны два способа ферментации: глубинный и поверхностный. По первому из них мицелий гриба погружен в питательную среду в аппаратах, называемых ферментаторами; по второму — мицелий располагается на поверхности среды в открытых кюветах, размещенных на многоярусных стеллажах в специальных

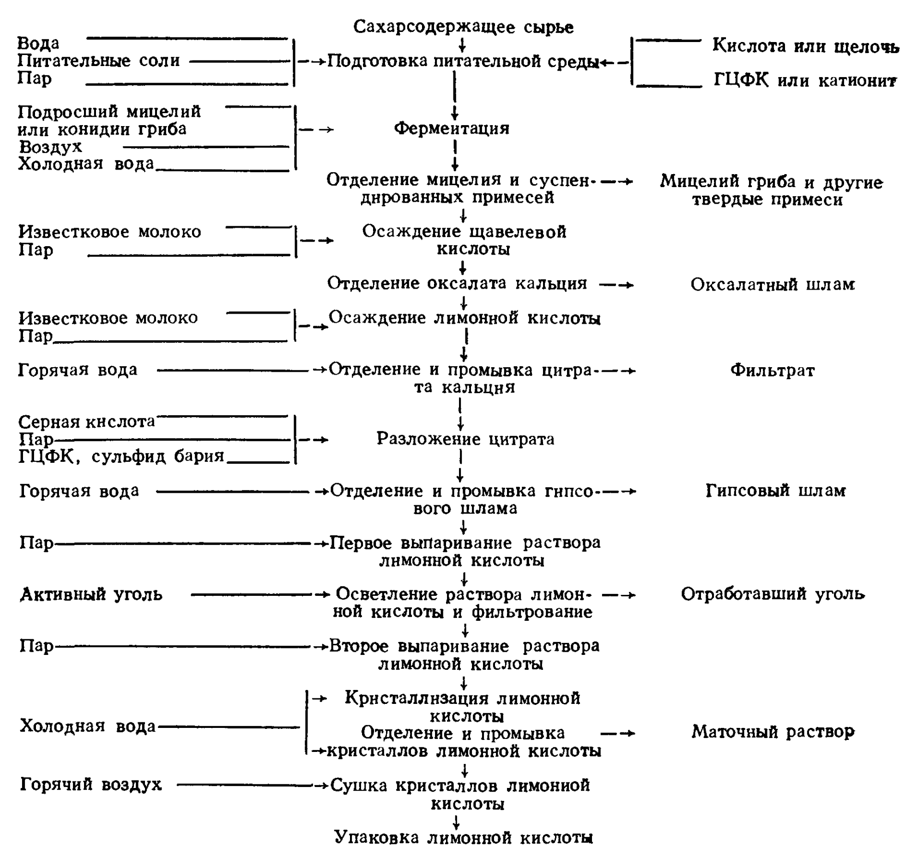


Схема производства лимонной кислоты

камерах. Так как грибы рода Aspergillus являются облигатными (строгими) аэробами, то в ферментаторы и растильные камеры непрерывно подают кондиционированный воздух. При дыхании гриба и образовании лимонной кислоты выделяется тепло, которое отводят из ферментаторов пропусканием холодной воды через «рубашку», а из камер — продуванием воздуха, поддерживая температуру питательной среды 30—32 °С.

По окончании ферментации (через 5—9 суток) от культуральной жидкости отделяют мицелий (при глубинной ферментации — фильтрованием на вакуум-фильтрах, при поверхностной — гравитационным способом или вручную, предварительно слив жидкость с кювет). После экстрагирования из мицелия остатков лимонной кислоты его направляют для использования в качестве добавки к животным кормам.

Фильтрованная культуральная жидкость представляет собой водный раствор лимонной кислоты, побочных (щавелевой и глюконовой) кислот, других метаболитов гриба, не ассимилированных им компонентов питательной среды и суспендированных частичек.

Последние образуются при обработке мелассных растворов ГЦФК, коагуляции коллоидов мелассы и разрушении мицелия гриба.

Лимонную кислоту из культуральной жидкости выделяют в виде плохо растворимой соли — цитрата кальция. С целью повышения чистоты цитрата, в большой мере определяющей эффективность проведения последующих технологических процессов, перед его осаждением необходимо из культуральной жидкости удалять взвешенные примеси центробежным сепарированием. С той же целью выделяют щавелевую кислоту в виде оксалата кальция, полностью выпадающего в осадок при pH ~ 3 и отделяемого фильтрованием [111]. Однако из-за стремления упростить технологию предварительную очистку культуральной жидкости от суспендированных частиц и щавелевой кислоты проводят не всегда.

К нагретой культуральной жидкости добавляют водную суспензию гидроксида кальция (известковое молоко) до pH > 6,0, при этом в результате реакции нейтрализации образуется осадок цитрата кальция. Если щавелевая кислота предварительно не выделялась, то осаждается и она. Кальциевые соли глюконовой кислоты в виду их хорошей растворимости не осаждаются. Химическое осаждение лимонной кислоты проводят в реакторе, называемом нейтрализатором.

Осадок цитрата отфильтровывают на фильтрах, работающих под вакуумом, и от него горячей водой отмывают остатки культуральной жидкости. Фильтрат упаривают и в виде концентрированного раствора реализуют в различных отраслях народного хозяйства. Часть промоев используют для разбавления мелассы при приготовлении питательной среды.

Цитрат кальция разлагают затем в отдельном реакторе («расщепителе») концентрированной серной кислотой, в результате чего освобождается лимонная кислота и выпадает осадок плохорастворимого гипса. При разложении цитрата оксалат не вступает в реакцию с серной кислотой и удаляется из реакционной смеси вместе с гипсом в процессе фильтрования. В реакторе цитрат суспендируют в небольшом количестве воды с таким расчетом, чтобы после разложения концентрация лимонной кислоты в растворе была не ниже 25 %. Приливание серной кислоты в цитратную суспензию сильно разогревает реакционную смесь. При последующем выдерживании с целью созревания кристаллов гипса заданную температуру поддерживают подачей пара.

По окончании разложения цитрата осаждают тяжелые металлы посредством ГЦФК, а мышьяк — сульфидом бария; их вместе с гипсом удаляют фильтрованием.

Проведение осаждения лимонной кислоты из культуральной жидкости в виде цитрата и разложения его серной кислотой при высокой температуре объясняется снижением растворимости цитрата и гипса. В первом случае уменьшаются потери цитрата с фильтратом и промывной водой, во втором — количество гипса,

выпадающего из раствора лимонной кислоты при его выпаривании и частично отлагающегося на поверхности нагрева вакуум-аппаратов.

Описанный способ выделения лимонной кислоты, основанный на проведении ее через малорастворимую соль, называется классическим (в данном случае еще и цитратным), характерным для химии прошлого века. Именно так Шееле выделял лимонную, винную, молочную и другие кислоты из соответствующих субстратов. По этому способу лимонную кислоту выделяют из ферментированных сред на всех заводах, кроме завода фирмы «Melle — Bezons», где лимонную кислоту экстрагируют селективным органическим растворителем непосредственно из ферментированных сред, а затем реэкстрагируют водой, раствор очищают, упаривают и кристаллизуют. «Бесцитратный» способ имеет существенные недостатки, почему и не получил распространения.

Следующий по схеме технологический процесс — осветление раствора лимонной кислоты активным углем. Более рационально осветление проводить в отсутствии большого количества суспендированного гипса и других примесей. В этом случае после отфильтровывания осадка гипса раствор лимонной кислоты подвергают частичному выпариванию в вакуум-аппаратах и только затем обрабатывают активным углем. Выпадающее при упаривании небольшое количество гипса удаляют вместе с отработавшим активным углем.

Однако нередко осветление раствора лимонной кислоты совмещают с разложением цитрата. Реакционную массу фильтруют, осадок, состоящий из гипса, оксалата кальция, сульфидов тяжелых металлов и мышьяка, берлинской лазури и активного угля, идет в отвал.

На Белгородском заводе наряду с традиционным осветлением раствора лимонной кислоты активным углем проводят более глубокую его очистку на катионитово-анионитовых установках При такой очистке исключается отложение гипса на поверхности нагрева выпарных аппаратов, чем создаются лучшие условия для применения непрерывного выпаривания в двухкорпусном агрегате с использованием в этом процессе вторичного пара и сокращением расхода свежего пара, появляется возможность без перекристаллизации вырабатывать продукт высшей категории качества, снизить количество маточников и иметь другие технологические преимущества.

Очищенный раствор лимонной кислоты вторично выпаривают под вакуумом и по достижении заданной концентрации (близкой к насыщению) сливают в кристаллизаторы, в которых постепенно снижают температуру. Выделившиеся кристаллы отделяют от маточного раствора на центрифугах, промывают небольшим количеством холодной воды, сушат и упаковывают.

Первый маточный раствор (с промывной водой) непосредственно или после осветления активным углем выпаривают, кристаллизуют, кристаллы отделяют, промывают и сушат. Второй маточный раствор осветляют активным углем и дальше перерабатывают так же, как и первый. Из этих кристаллов и кристаллов, полученных из основного раствора, составляют товарные партии

лимонной кислоты. Третий маточный раствор в зависимости от его чистоты возвращают в нейтрализатор или разбавляют водой до 15%-ной концентрации (по лимонной кислоте), осветляют активным углем и получают цитрат, который присоединяют к основной массе цитрата в реакторе для разложения его серной кислотой.

Производство молочной кислоты

Процессы технологии молочной кислоты в основных чертах аналогичны описанным выше, но конечный продукт выпускается в виде водных растворов различной концентрации. Это объясняется тем, что кристаллы молочной кислоты имеют низкую температуру плавления и очень гигроскопичны.

На с. 18 представлена технологическая схема производства молочной кислоты из сахарсодержащего сырья.

В бродильном аппарате (чане) из смеси мелассы, рафинадной патоки и сахара-сырца готовят питательную среду (сусло) разбавлением сырья водой до определенной концентрации и добавлением дополнительного источника аминного азота, витаминов и других биологически активных веществ, необходимых для нормальной жизнедеятельности молочнокислых бактерий.

Затем сусло в том же аппарате пастеризуют, охлаждают до 48—50 °С и засевают культурой L. delbrückii. Указанная температура оптимальна для термофильных молочнокислых бактерий и находится далеко за пределами температурного оптимума для большинства других микроорганизмов. Это обеспечивает сохранение культуры молочнокислых бактерий в естественночистом состоянии при брожении даже в открытых аппаратах.

L. delbrückii, как и все молочнокислые бактерии, являются факультативным анаэробом, поэтому брожение ведут без аэрации. Молочная кислота угнетает не только постороннюю микрофлору, но при определенном содержании и сами молочнокислые бактерии, поэтому ее периодически нейтрализуют стерилизованным карбонатом кальция (мелом), поддерживая величину pH на оптимальном уровне. Образующийся лактат кальция остается растворенным, и к концу брожения его накапливается около 15 % (содержание, близкое к насыщенному раствору при данной температуре).

По завершении брожения, продолжающегося 8—10 суток, проводят пастеризацию и оставшееся небольшое количество свободной молочной кислоты нейтрализуют известковым молоком до pH 8—10, затем фильтруют или отстаивают. Лактат отмывают от осадка, состоящего из не вступившего в реакцию мела и других взвешенных частиц.

Горячий раствор лактата кальция сливают в кристаллизатор и кристаллизуют, постепенно снижая температуру. По окончании кристаллизации массу направляют на центрифугу или на фильтр-пресс для отделения кристаллов. Их промывают холодной водой,

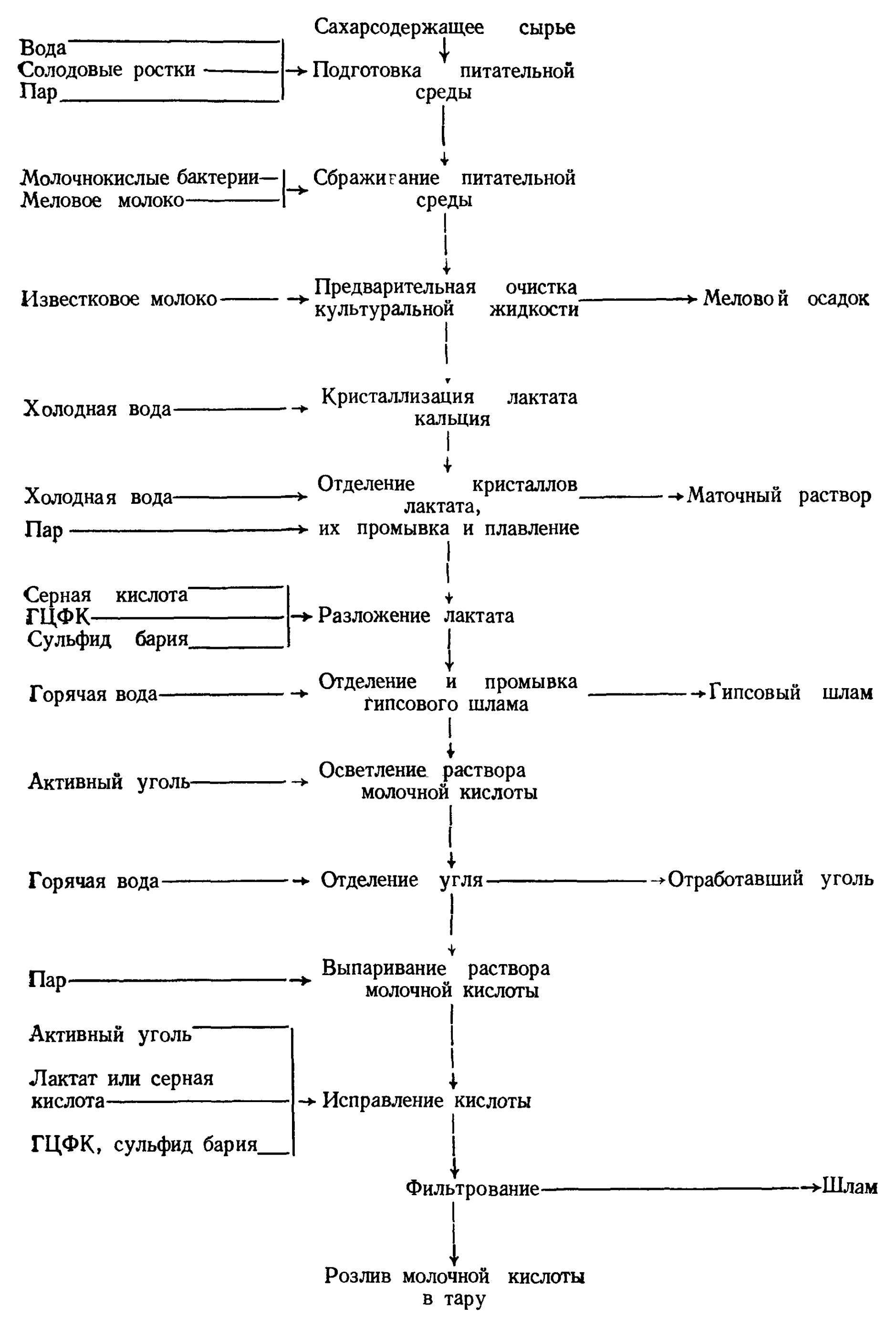


Схема производства молочной кислоты

расплавляют паром и передают в реакторы для разложения серной кислотой.

Разложение лактата и очистку раствора молочной кислоты проводят аналогично разложению цитрата и очистке раствора лимонной кислоты и также часто совмещают оба эти процесса. В реакторе лактат разбавляют промывной водой, полученной от промывки гипсового шлама, до концентрации около 18 %, при разложении серной кислотой поддерживают температуру около 80 °С, осаждают железо, тяжелые металлы ГЦФК, а мышьяк — сульфидом бария и, наконец, добавляют активный уголь.

После фильтрования раствор молочной кислоты выпаривают в вакуум-аппаратах до концентрации, большей 40 %. В отдельной емкости дополнительно осветляют активным углем, при содержании свободной серной кислоты или неразложенного лактата, железа, тяжелых металлов и мышьяка молочную кислоту исправляют добавлением эквивалентных количеств соответственно лактата или серной кислоты, ГЦФК и сульфида бария. Затем кислоту купажируют — доводят умягченной водой до стандартной концентрации (обычно 40 %), отстаивают, фильтруют и разливают в стеклянную или полиэтиленовую тару. При необходимости выпуска молочной кислоты большей концентрации проводят второе упаривание.

Известны варианты описанной схемы. Так, в основном из сахара-сырца, содержащего меньше примесей, минуя стадию кристаллизации лактата, но применяя катионитово-анионитовую обработку растворов молочной кислоты, получают готовую кислоту вполне удовлетворительного качества. Еще лучше, если возможно, исходить из кристаллического сахара или глюкозных сиропов. Опубликованы патенты на извлечение молочной кислоты из сброженных сахарных сред селективной экстракцией органическими растворителями, на очистку растворов молочной кислоты дистилляцией с водяным паром, этерификацией спиртами с последующей отгонкой и омылением эфира, но широкой практической реализации эти способы не получили.

Производство винной кислоты

В побочных продуктах виноделия винная кислота уже содержится в виде солей, поэтому в производстве винной кислоты из этого вида сырья стадия ферментации отсутствует. В настоящее время отечественные заводы винной кислоты пользуются в качестве сырья только виннокислой известью и винным камнем, что значительно упростило технологию.

Побочные продукты виноделия комплексно перерабатывают в специализированных цехах, получая наряду с виннокислой известью этиловый спирт, энокраситель, пектин, виноградное масло (из семян) и кормовую муку. Виннокислые соединения извлекают растворами серной кислоты или карбоната натрия небольшой концентрации, а затем осаждают гидроксидом и хлоридом каль-

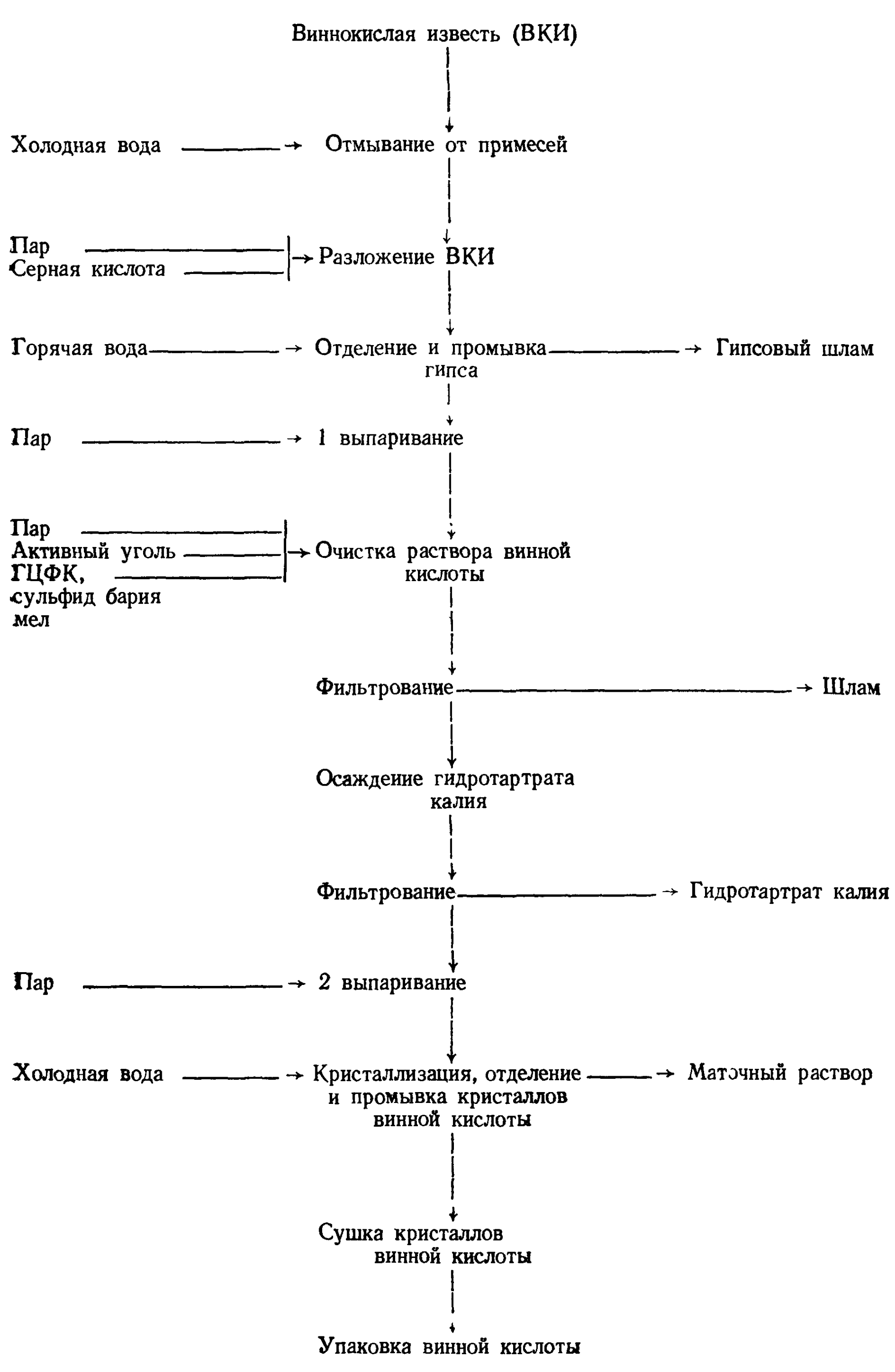


Схема производства винной кислоты

ция в виде виннокислой извести (ВКИ). Винный камень переводят в ВКИ непосредственно раствором хлорида кальция с добавлением карбоната кальция.

ВКИ как поступающую на завод винной кислоты, так и получаемую на нем из винного камня тщательно отмывают от примеси различных солей, красящих и других веществ. Как видно из приведенной схемы, дальнейшая переработка ВКИ на кристаллическую винную кислоту в принципе не отличается от переработки цитрата кальция в лимонную кислоту. Загруженную в реактор ВКИ смешивают с водой, полученной от промывки гипса, нагревают и постепенно прибавляют серную кислоту. Реакционную массу фильтруют, осадок (гипс) промывают горячей водой, а раствор винной кислоты выпаривают в вакуум-аппарате в два приема с промежуточной очисткой раствора.

Очищают раствор от соединений железа, меди, свинца, мышьяка, красящих веществ в отдельном реакторе. Шлам отфильтровывают, затем осаждают гидротартрат калия, фильтруют, раствор винной кислоты выпаривают в вакуум-аппарате, кристаллизуют, кристаллы отделяют и промывают. Первый маточный раствор упаривают, кристаллизуют, кристаллы отделяют и промывают; второй маточный раствор перерабатывают аналогично. Из третьего маточного раствора получают неочищенные кристаллы, четвертый маточный раствор возвращают в расщепитель (основной раствор винной кислоты).

Основную массу неочищенных кристаллов по мере их накопления растворяют в воде, растворы очищают, кристаллизуют, кристаллы отделяют и промывают. В получающемся маточном растворе растворяют некоторое количество неочищенных кристаллов, раствор очищают, упаривают, кристаллизуют, кристаллы отделяют и промывают. Последующие маточные растворы (а их бывает до пяти) перерабатывают так же, как и предыдущий, получая товарные кристаллы. Все товарные кристаллы сушат до стандартной влажности.

Задачи совершенствования производства

Основной задачей развития СССР на ближайшую пятилетку является обеспечение дальнейшего экономического прогресса общества, глубоких качественных сдвигов в материально-технической базе на основе интенсификации общественного производства, повышения его эффективности и ускорения научно-технического прогресса.

В производстве лимонной, молочной и винной кислот много общих научно-технических задач. Значительная часть технологических процессов этих производств — периодические и проводятся в аппаратах небольшой единичной мощности, с затратой в отдельных из них физического труда, в связи с чем представляется актуальным создание непрерывных процессов. В первую очередь это относится к производству лимонной кислоты, как самому круп-

ному и получающему в новой пятилетке существенное наращивание мощностей.

Освоение непрерывных процессов, высокопроизводительного оборудования, комплексной механизации и автоматизации процессов позволит интенсифицировать производство пищевых кислот, резко повысить производительность труда и другие технико-экономические показатели. Однако этим не исчерпываются все резервы интенсификации и повышения эффективности производства. Продолжительность отдельных стадий производства, особенно ферментации, очень велика. Необходима их интенсификация, например, ферментации путем применения более активных штаммов микроорганизмов и стимуляторов кислотообразования. При периодических процессах нужно сократить продолжительность межцикловых обработок оборудования, простоев, повысить коэффициент его использования.

Важной задачей является также снижение материальных затрат — сырья, основных материалов, топлива, энергии и воды. В производстве лимонной кислоты уменьшение удельного расхода мелассы может быть достигнуто повышением продуктивности биосинтеза лимонной кислоты селекционированием соответствующих штаммов продуцента, воздействием на ферментные системы гриба в процессе ферментации (регулирование роста, дыхания, образования побочных кислот), оптимизацией состава питательной среды, проведением ферментации в асептических условиях, снижением потерь лимонной кислоты при химической переработке ферментированных сред.

Должны быть упорядочены и ужесточены нормы расхода топлива, пара, электроэнергии; организовано оборотное водоснабжение. Уменьшение материальных затрат снизит себестоимость пищевых кислот. Большое значение имеет качество пищевых кислот, которое может быть повышено внедрением комплексной системы управления качеством продукции.

В производстве пищевых кислот не решена проблема создания безотходного производства и очистки сточных вод. На технико-экономические показатели работы заводов большое влияние оказывает их единичная мощность, нуждающаяся в увеличении.

Ближайшими мероприятиями являются: завершение перевода всех заводов лимонной кислоты на работу по способу глубинной ферментации, полная замена морально устаревшего и физически изношенного оборудования новым, прогрессивным.

Глава 2. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОКСИКИСЛОТ

ХИМИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ

Молочная, винная и лимонная кислоты в химическом отношении принадлежат к классу ациклических оксикислот, т. е. соединений, содержащих одновременно спиртовый гид-

роксил и карбоксильную группу. Их можно рассматривать как гидроксильные производные карбоновых кислот. Так, при замещении водорода в радикале пропионовой кислоты спиртовым гидроксилом получается оксипропионовая, или молочная кислота:

$$CH_3—CH_2—COOH \rightarrow CH_3—\overset{*}{C}H(OH)—COOH;$$

при замещении водорода в двух радикалах янтарной кислоты образуется диоксиянтарная, или винная кислота:

$$HOOC—CH_2—CH_2—COOH \rightarrow HOOC—\overset{*}{C}H(OH)—\overset{*}{C}H(OH)—COOH;$$

при замещении в одном радикале трикарбаллиловой кислоты — окситрикарбаллиловая, или лимонная кислота:

$$HOOC—CH_2—\underset{}{\overset{COOH}{\overset{|}{C}}}H—CH_2—COOH \rightarrow HOOC—CH_2—\overset{COOH}{\overset{|}{C}}(OH)—CH_2—COOH.$$

В отличие от предыдущих двух оксикислот, лимонная кислота имеет разветвленную цепь углеродных атомов.

Основность оксикислот определяется числом карбоксильных групп, а атомность — числом гидроксилов, включая и гидроксилы карбоксильных групп. Таким образом, молочная кислота — одноосновная двухатомная оксикислота, винная и лимонная — соответственно двух- и трехосновные многоатомные оксикислоты.

Положение спиртового гидроксила обозначают буквой греческого алфавита, начиная обозначение от атома углерода, непосредственно связанного с карбоксильной группой. В зависимости от места спиртового гидроксила различают, например, α- и β-оксипропионовую кислоты:

$$CH_3—CH(\overset{\alpha}{O}H)—COOH; \quad CH_2(\overset{\beta}{O}H)—CH_2—COOH.$$

По наличию радикалов этилидена и этилена первая носит еще название этилиденмолочной, вторая — этиленмолочной.

Как показывает формула лимонной кислоты, ее можно рассматривать как α-оксикислоту по отношению к центральной карбоксильной группе и как β-оксикислоту по отношению к крайним карбоксилам.

Молочные кислоты

Как сообщалось ранее, α-оксипропионовую кислоту в промышленном масштабе получают сбраживанием сахара молочнокислыми бактериями или химическим синтезом, β-оксипропионовую — исключительно химическими методами. При сбраживании альдогексозы из одной ее молекулы образуется две молекулы молочной кислоты:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_3H_6O_3.$$

В производстве искусственных волокон из ацетилена циангидриновым методом в качестве побочного продукта образуется лактонитрил, гидролизом которого серной кислотой получается α-оксипропионовая кислота:

$$CH{=}CH + HCN + H_2O \rightarrow CH_3CH(OH)CN;$$
$$CH_3CH(OH)CN + H_2SO_4 + 2H_2O \rightarrow CH_3CH(OH)COOH + NH_4HSO_4.$$

Таким методом, например, на химическом заводе «Monsanto Industries Chemicals Co.» (США) по довольно простой технологии вырабатывают очень чистую и дешевую молочную кислоту. Разработан способ каталитической гидратации лактонитрила без образования сульфата аммония.

При синтезе молочной кислоты из пропилена ($CH_3{-}CH{=}CH_2$) его окисляют оксидом азота (N_2O_4) в α-нитратопропионовую кислоту, которую затем гидролизуют:

$$CH_3CH(ONO_2)COOH + H_2O \rightarrow CH_3CH(OH)COOH + HNO_3.$$

Известны и другие химические методы, например, исходя из дихлорацетона ($CH_3COCHCl_2$), 1-нитро-2-пропанола.

Так как средний углеродный атом в молекуле α-оксипропионовой кислоты асимметрический, то она может существовать в виде двух оптических изомеров:

```
    COOH              COOH
     |                 |
  H—C—OH           OH—C—H
     |                 |
    CH3               CH3
```

D (—)-молочная кислота   L (+)-молочная кислота

Изомеры отличаются только пространственным расположением водородных атомов и спиртовых гидроксилов и представляют собой зеркальное изображение друг друга (оптические антиподы, анантиостереоизомеры). Изомер, расположенный слева, называется D-молочной кислотой, но имеет левое оптическое вращение и обозначается D(—)-молочная кислота:- изомер, расположенный справа, называется L-молочной кислотой с правым оптическим вращением и обозначается L(+)-молочная кислота.

Принадлежность молочной кислоты к D- или L-ряду отражает ее конфигурацию по сравнению с абсолютной, принятой для D- и L-глицеринового альдегида с соответствующим расположением H и OH при углеродном атоме, ближайшем к первичной спиртовой группе ($-CH_2OH$). В отличие от глицеринового альдегида правое и левое вращения молочной кислоты не совпадают с D- и L-рядом. Объясняется это тем, что вращение зависит не только от расположения H и OH, но и от природы остальных групп, связанных с асимметрическим атомом углерода (группы $-CH_3$ вместо $-CH_2OH$, карбоксильной группы вместо альдегидной).

При получении молочной кислоты с помощью L. delbrückii и химическом синтезе образуется оптически недеятельная D, L-молочная кислота, представляющая собой рацемическую смесь обоих изомеров. Однако в молочной кислоте брожения нередко наблюдается слабое правое или левое вращение.

D-молочная кислота не усваивается организмом, L-молочная кислота полностью усваивается, содержится в мышечной ткани как продукт гликолиза, откуда она была выделена в 1832 г. Ю. Либихом и названа мясомолочной кислотой [90]. Индивиду-

альные D- и L-молочные кислоты можно получить сбраживанием сред сложного состава специальными штаммами молочнокислых бактерий или микроскопических грибов.

Винные кислоты

Винная кислота имеет два асимметрических атома углерода и существует в трех стереоизомерных формах:

$$\begin{array}{c} COOH \\ | \\ OH-C-H \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ COOH \end{array} \qquad \begin{array}{c} COOH \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ OH-C-H \\ | \\ COOH \end{array} \qquad \begin{array}{c} COOH \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ COOH \end{array}$$

D (—)-винная кислота | L (+)-винная кислота | Мезовинная кислота

В левовращающей D-винной кислоте и правовращающей L-винной кислоте группы H, COOH и OH у каждого асимметрического атома углерода расположены соответственно против и по часовой стрелке. В третьем изомере винной кислоты в одной половине молекулы указанные выше группы расположены по часовой стрелке, а в другой — против. Вследствие компенсации правого и левого вращения молекула кислоты становится оптически недеятельной. Такая оптически недеятельная кислота, названная мезовинной, представляет собой наиболее устойчивую форму молекулы винной кислоты, что обусловлено симметричностью ее конфигурации. Мезовинную кислоту нельзя разделить на антиподы.

D- и L-винные кислоты в эквивалентных количествах образуют оптически недеятельную D, L-винную кислоту, которую Й. Берцелиус назвал виноградной, или рацемической (лат. racemus — виноград), сокращенно — r-винной. За ней сохранилось также название i-винной (лат. inactivus — недеятельный). В настоящее время под рацемической понимают оптически недеятельную смесь анантиомеров не только винной, но и молочной кислоты и других веществ, а превращение одного анантиомера в другой называют рацемизацией.

Легче рацемизуются соединения, имеющие асимметрический атом углерода в α-положении к карбонилу, карбоксилу и вообще к электрофильному заместителю при условии, что у асимметрического атома углерода находится атом водорода, что объясняется протонизацией последнего. Поэтому, например, α-оксипропионовая кислота рацемизуется легко, однако для этого необходимы температура 130—150 °C и присутствие щелочей. Рацемизация вызывается также некоторыми микроорганизмами.

D,L-винная кислота имеет значительно более высокую температуру плавления и меньшую растворимость в воде, чем входящие в ее состав анантиомеры (см. табл. 2 на с. 27). Из этого следует, что кристаллическая структура рацемической кислоты обладает

большей стабильностью; упаковка кристаллов анантиомеров в соотношении 1 : 1 плотнее, чем упаковка каждого отдельного стереоизомера. Предполагается, что D,L-винная кислота представляет собой не простую смесь изомеров, а химическое соединение.

В винограде и продуктах его переработки содержится L-винная кислота и небольшое количество виноградной кислоты, главным образом в виде солей. Мезовинная кислота в природе не найдена и образуется из всех изомеров при кипячении в щелочных растворах.

Синтетическое получение виноградной кислоты методом каталитического гидроксилирования двойной связи малеиновой кислоты основано на реакции:

$$\mathrm{HOOH{-}CH{=}CH{-}COOH \xrightarrow{H_2O_2} HOOC{-}CH\,(OH){-}CH\,(OH){-}COOH.}$$

Лимонные кислоты

При культивировании на сахарсодержащих средах Asp. niger образует лимонную кислоту, при культивировании на н-парафинах дрожжей рода Candida наряду с лимонной в значительных количествах образуется и изолимонная кислота:

$$\mathrm{HOOC{-}CH\,(OH){-}\overset{\overset{\displaystyle COOH}{|}}{C}H{-}CH_2{-}COOH.}$$

Известна еще алло-изолимонная кислота — стереоизомер изолимонной кислоты:

$$\mathrm{HOOC{-}CH\,(OH){-}\underset{\underset{\displaystyle COOH}{|}}{C}H{-}CH_2{-}COOH.}$$

Изолимонная и алло-изолимонная кислоты образуются в цикле трикарбоновых кислот как промежуточные продукты метаболизма углеводов (алло-изолимонная кислота — при культивировании пенициллов).

Сырьем для циангидриинового синтеза лимонной кислоты служат ацетон или его производные — дихлорацетон и кетен:

$$\mathrm{(ClCH_2)_2C{=}O \xrightarrow{+HCN} (ClCH_2)_2C(OH)CN \xrightarrow[-NH_3]{+2H_2O} (ClCH_2)_2C(OH)COOH \xrightarrow[-2HCl]{+2HCN}}$$

$$\mathrm{\rightarrow (NC{-}CH_2)_2C(OH)COOH \xrightarrow[-2NH_3]{+4H_2O} (HOOC{-}CH_2)_2C(OH)COOH.}$$

Кетен ($CH_2{=}C{=}O$) получают пиролизом ацетона или уксусной кислоты и полимеризуют в дикетен (β-лактон енольной формы ацетоуксусной кислоты). Лимонную кислоту можно получить также, исходя из 3-цикло-пентена-1.

ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Винная и лимонная кислоты — кристаллические продукты. Молочная кислота в определенных условиях также может существовать в кристаллической форме, но в силу особых свойств, как правило, представляет собой сиропообразную жидкость. В табл. 2 дана характеристика некоторых физических свойств этих оксикислот.

Таблица 2

Физические константы оксикислот

Кислота	Эмпирическая формула	Молекулярная масса	Температура плавления, °С	Плотность, d_4^{20}	Удельное вращение, $[\alpha]_D^*$	Растворимость при 20 °С, г безводного вещества на 100 г воды
D(—)-Молочная	$C_3H_6O_3$	90,08	26**	1,2485***	—2,5****	—
L(+)-Молочная	$C_3H_6O_3$	90,08	26	1,2485	+2,5	—
D, L-Молочная	$C_3H_6O_3$	90,08	18	1,2485	0	126
D(—)-Винная	$C_4H_6O_6$	150,09	170	1,7598	—12	135
L(+)-Винная	$C_4H_6O_6$	150,09	170	1,7598	+12	135
D, L-Винная (виноградная)	$C_4H_6O_6$	150,09	206	1,6970	0	20,6
D, L-Винная (виноградная)	$C_4H_6O_6 \cdot 0,5H_2O$	159,11	100	—	0	—
Мезовинная	$C_4H_6O_6$	150,09	140	1,6660	0	167
Лимонная	$C_6H_8O_7$	192,12	153	1,6650	0	147
Лимонная	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	210,14	70—75	1,5420	0	147

* Для раствора молочной кислоты, содержащего 20% мас. при температуре 25 °С; для раствора винной кислоты $[\alpha]_D = 14,85 - 0,14\,p$, где p—% мас. кислоты при 20 °С.

** По данным [107] для D-и L-молочных кислот 54 °С, для D, L-молочной кислоты 30 °С.

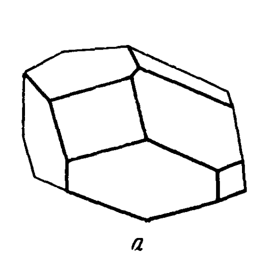
*** Для раствора, содержащего 100% мас. молочной кислоты.

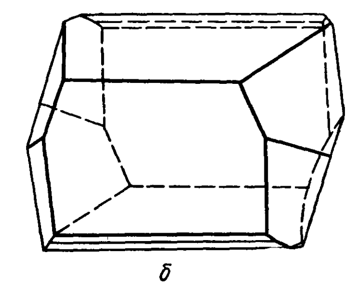
**** Для 10%-го раствора, по другим данным—3,82°.

Кристаллографические сингонии (системы)

D- и L-винные кислоты из водных растворов кристаллизуются в форме косых ромбических или моноклиноэдрических бесцветных призм, передние углы которых, как правило, притуплены гемиэдрическими плоскостями, кристаллизационной воды не содержат.

Виноградная кислота кристаллизуется из водных растворов гидратной $(2C_4H_6O_6) \cdot H_2O$ в форме ромбических призм, из спирта при температуре выше 73 °С — безводной. Кристаллогидрат плавится при 100 °С, теряет воду при 110 °С. Кристаллы мезовинной кислоты — призматические, иногда в виде листочков (чешуек), по химическому составу отвечающие формуле $C_4H_6O_6 \cdot H_2O$.





а б

Рис 1 Кристаллы лимонной кислоты:
а — гидратной, *б* — безводной.

Лимонная кислота при температуре ниже 36,6 °С кристаллизуется с одной молекулой воды в форме больших бесцветных ромбических призм, при температуре выше 36,6 °С — безводной в форме моноклинных призм (рис. 1). Гидратная лимонная кислота — $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ содержит 8,58 % мас. воды. В сухом воздухе кристаллизационная вода, входящая в кристаллизационную решетку, теряется (выветривается), вследствие чего кристаллы становятся непрозрачными и рассыпаются. При медленном нагревании до 70—75 °С кристаллы размягчаются, при быстром нагревании до 100 °С — плавятся, при 130 °С — полностью теряют кристаллизационную воду.

Молочная кислота в кристаллической форме может быть получена обезвоживанием ее раствора под вакуумом (остаточное давление 133 Па) при температуре около 85 °С. Именно в таких условиях кристаллы (призмы) молочной кислоты впервые получили в 1895 г. Крафт и Динс.

Считается, что кристаллы молочной кислоты очень гигроскопичны и в обычных условиях легко плавятся. Однако, по мнению некоторых исследователей, действительная причина невозможности получения кристаллической молочной кислоты, по-видимому, кроется главным образом не в сорбции влаги из воздуха, а в выделении ее в результате энергично протекающей этерификации — образования лактида. Отщепление воды наблюдается при хранении молочной кислоты в эксикаторе над концентрированной серной кислотой.

Растворимость в воде и органических растворителях

Благодаря наличию спиртового гидроксила молочная, винная и лимонная кислоты хорошо растворяются в воде, причем их растворимость возрастает с повышением температуры. Для удобства производственных расчетов растворимость обычно выражают в массовых процентах или в килограммах безводной кислоты на 1 кг воды.

Растворимость D,L-молочной кислоты приведена в табл. 3 (по Д. Маллину).

Растворимость лимонной кислоты в воде изучали Р. Креман и Г. Эйтель, Л. Дальман, Я. М. Слободин и Н. Я. Новотельнова.

Как видно из рис. 2, кривая растворимости имеет перелом при температуре 36,6 °С, соответствующей точке перехода кристаллогидрата в ангидрид (безводную форму). Растворимость на нижнем участке кривой описывается уравнением [48]:

$$P_0 = 49{,}9300 + 0{,}5303t,$$

на верхнем участке

$$P_0' = 59{,}8730 + 2{,}21170\left(\frac{t}{10}\right) + 0{,}03079\left(\frac{t}{10}\right)^2,$$

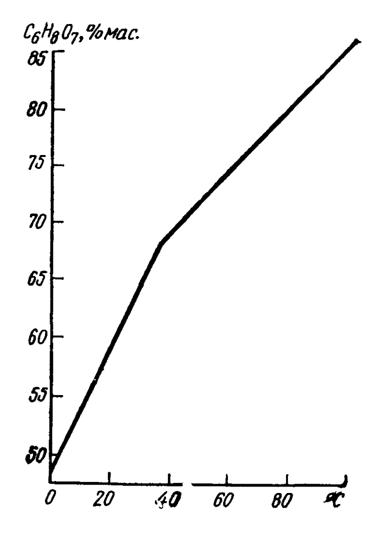


Рис 2. Растворимость лимонной кислоты в воде в зависимости от температуры

где P_0 и P_0' — растворимость кислоты в воде, % мас; t — температура, °С.

Таблица 3

Растворимость D, L-молочной кислоты в воде

Температура, °С	Растворено кг кислоты на 1 кг воды	Температура, °С	Растворено кг кислоты на 1 кг воды
0	0,89	40	1,80
10	1,05	60	2,70
20	1,26	80	4,60
30	1,50	—	—

Растворимость лимонной кислоты, вычисленная по этим уравнениям, дана в табл. I приложения.

Растворимость винной кислоты впервые исследовал Л. Дальман. По данным [47], в температурном интервале 0—100 °С растворимость винной кислоты описывается уравнением:

$$P_0 = 52{,}735 + 2{,}256\left(\frac{t}{10}\right) + 0{,}032\left(\frac{t}{10}\right)^2.$$

Она приведена также в табл. II приложения.

Относительная плотность растворов оксикислот может быть вычислена по формуле

$$d = d_в + Ax + Bx^2 + Cx^3,$$

где $d_в$ — плотность воды при данной температуре; x — концентрация оксикислоты в растворе, % мас; A, B и C — константы, определяемые по табл. 4.

Таблица 4

Константы для оксикислот

Кислота	Температура, °C	Концентрация, % мас.	Значение констант×10^3		
			A	*B*	*C*
Винная	15	0—15	4,482	0,01850	0
Лимонная	18	0—50	3,824	0,01140	0,000017
Молочная	25	0—9	2,310	0,00186	0

Для растворов лимонной кислоты можно также пользоваться формулой [4]:

$$\rho = (1,01 + 0,47x)\,10^3 - 0,51t,$$

где ρ — плотность, кг/м^3; x — массовая доля лимонной кислоты в растворе, t — температура, °C.

Относительная плотность водных растворов оксикислот приведена в табл. III—V приложения.

Молочная кислота смешивается с этиловым спиртом во всех соотношениях. Растворимость винной кислоты при 15 °C в 100 г: этилового спирта 25,6 г, этилового эфира 0,39 г; в хлороформе винная кислота нерастворима. Моногидратная лимонная кислота растворяется в органических растворителях несколько лучше, чем безводная. Моногидратной лимонной кислоты растворяется (в г/100 г): метилового спирта 66,3, дихлорэтана 0,005 (15 °C), амилового спирта — 15,43, пропилового спирта — 38,6, этилового эфира — 2,17, этилацетата — 5,28, амилацетата — 5,98, хлороформа — 0,007 (19 °C). В бензоле, толуоле и сероуглероде лимонная кислота не растворяется. Растворимость лимонной кислоты в этиловом спирте показана в табл. 5.

Таблица 5

Растворимость лимонной кислоты в этиловом спирте при 25°C

Концентрация спирта, % мас.	Растворено г на 100 г растворителя	
	моногидрата	ангидрида
20	66,0	62,3
40	64,3	59,0
50	63,3	—
60	62,0	54,8
80	58,1	48,5
100	49,8	38,3

Практический интерес представляют некоторые органические растворители и их смеси, селективно экстрагирующие оксикислоты из нечистых растворов (подробнее см. с. 176).

Вязкость и поверхностное натяжение растворов

Динамическая вязкость растворов лимонной кислоты в температурном интервале 0—100 °C может быть выражена уравнением [3]:

$$\frac{\eta_р}{\eta_в} = \exp\left(7{,}4x^{1,65} \cdot \frac{100}{100+t}\right),$$

где $\eta_р$ — коэффициент динамической вязкости раствора при данных концентрации и температуре, Па·с; $\eta_в$ — коэффициент динамической вязкости воды при той же температуре, Па·с, t — температура, °С, x — массовая доля лимонной кислоты в растворе

Коэффициент динамической вязкости воды может быть взят из химических справочников или вычислен по уравнению:

$$\eta_{вt} = 1{,}8\cdot 10^{-3} \exp\left(-3{,}3\frac{t}{100+t}\right).$$

Динамическая вязкость растворов молочной кислоты при температуре 25 °С приведена в табл. 6 (по данным «Monsanto Industries Chemicals Co.»).

Таблица 6

Динамическая вязкость растворов молочной кислоты

Концентрация, % мас.	Вязкость, МПа·с	Концентрация, % мас.	Вязкость, МПа с
6,29	1,04	54,94	4,68
9,16	1,15	64,89	6,96
12,19	1,21	75,33	13,03
24,35	1,67	85,32	28,50
37,30	2,45	88,60	36,90
45,48	3,09	—	—

Поверхностное натяжение $^1/_6$ моляльного раствора лимонной кислоты на границе с воздухом при температуре 30 °С равно $\sigma = 69{,}5\cdot 10^{-3}$ Н/м. Поверхностное натяжение растворов лимонной кислоты в зависимости от их концентрации и температуры описывается уравнением [2]:

$$\sigma = \sigma_{вt} - 15\frac{x}{x+0{,}5}(1-10^{-2}t) \text{ Н/м},$$

где $\sigma_{вt}$ — поверхностное натяжение воды при данной температуре (приводится в химических справочниках); x — массовая доля лимонной кислоты в растворе; t — температура, °С.

Поверхностное натяжение на границе раздела раствор лимонной кислоты — пар изменяется не более чем на 0,3 %, т. е. находится в пределах погрешности опыта.

Теплофизические свойства

Теплота сгорания равна (в кДж/(г-моль): молочной кислоты 1376,5; винной 1096,7; лимонной безводной 1985,3 и гидратной 1972,3.

Растворение оксикислот в воде сопровождается поглощением тепла и соответственно понижением температуры раствора. За

теплоту растворения обычно принимают изменение энтальпии (теплового эффекта), связанное с растворением единицы количества растворяемого вещества в избыточном количестве чистого растворителя, т. е. при бесконечном разбавлении. Под последним практически понимают концентрацию вещества в растворе 0,01 моля и меньше.

Изменение энтальпии при образовании водного раствора из 1 моля вещества и n молей воды вычисляют по уравнению:

$$\Delta H = H - nH_0 - H_1,$$

где H — энтальпия раствора, кДж; H_0 — энтальпия воды, кДж/моль; H_1 — энтальпия вещества, кДж/моль.

По одним данным, при $n=100$ и начальной температуре компонентов 9,7 °С ΔH равно (кДж/моль): для D- и L-винных кислот —13,70; для D,L-винной кислоты (безводной) —21,94; для лимонной кислоты (безводной) при начальной температуре 15 °С ΔH = —26,8. По другим данным, при начальной температуре от 18 до 25 °С ΔH равно: для D- и L-винных кислот— 14,67, для D,L-винной и лимонной кислот (безводных) —22,62, для молочной —13,83.

При кристаллизации оксикислот теплота выделяется и температура раствора повышается. Экспериментальное определение теплоты кристаллизации встречает затруднения, поэтому за абсолютное ее значение принимают теплоту растворения (изменение энтальпии), но с обратным знаком. Приведенные выше данные о величине $\Delta H_{крис}$ относятся к выделению оксикислот в твердую фазу в безводном состоянии. Теплота кристаллизации при выделении твердой фазы в виде кристаллогидрата повышается. При этом на каждый моль кристаллизационной воды приходится такое увеличение теплоты, которое соответствует теплоте плавления льда (5,99 кДж/моль), увеличенной на энергию связи гидратации.

Молярная теплоемкость оксикислот, как и других твердых органических соединений, в первом приближении при температуре 18—20 °С может быть вычислена по правилу Неймана — Коппа, согласно которому она равна сумме атомных теплоемкостей составляющих атомов. Атомные теплоемкости равны: для С = 1,8;

Таблица 7

Теплоемкость оксикислот

Кислота	Формула	Расчетная		Опытная
		молярная, КДж/(моль×°С)	удельная, кДж/(кг·°С)	удельная, кДж/(кг·°С)
Лимонная	$C_6H_8O_7$	0,239	1,244	—
Лимонная	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	0,280	1,333	1,33
Винная	$C_4H_6O_6$	0,189	1,260	1,28
Виноградная	$2C_4H_6O_6 \cdot H_2O$	0,230	1,370	1,39
Молочная	$C_3H_6O_3$	0,131	1,455	1,42

$O=4{,}0$; $H=2{,}3$; H_2O (кристаллизационная) $=9{,}8$. В соответствии с этим расчетные теплоемкости будут равны (табл. 7).

Удельная теплоемкость [кДж/(кг·°С)] водных растворов лимонной, винной и молочной кислот аппроксимируется следующими уравнениями [68]:

$$C_{\text{л.к}} = (0{,}99 - 0{,}66x + 0{,}0010t)\cdot 4{,}19;$$
$$C_{\text{в.к}} = (0{,}99 - 0{,}62x + 0{,}0011t)\cdot 4{,}19;$$
$$C_{\text{м.к}} = (0{,}99 - 0{,}68x + 0{,}0015t)\cdot 4{,}19,$$

где x — массовая доля кислоты в растворе; t — температура, °С.

Коэффициент теплопроводности гидратной лимонной кислоты при температуре 30 °С равен 0,177, при 50 °С — 0,174 Вт/(м·°С); коэффициент температуропроводности λ при 30 С равен 0,1430, при 50 °С — 0,1417 м²/с.

Температурная депрессия растворов при любом внешнем давлении может быть определена по уравнению И. А. Тищенко:

$$\Delta t = 1{,}62\cdot 10^{-2}(T/r)\,\Delta t_{\text{атм}},$$

где $\Delta t_{\text{атм}}$ — температурная депрессия при атмосферном давлении, °С; T — температура кипения чистого растворителя, К; r — теплота испарения растворителя при данном давлении, кДж/кг.

Температурная депрессия растворов лимонной кислоты при атмосферном давлении описывается уравнением [68]:

$$\Delta t_{\text{атм}} = \exp\left(\frac{1{,}6x}{1-0{,}6x}\right) - 1,$$

где x — массовая доля кислоты в растворе.

Температура кипения растворов лимонной кислоты в зависимости от внешнего давления, по данным Е. И. Журавлевой и И. Е. Невской, приведена в табл. VI приложения.

Температура кипения растворов молочной кислоты различной концентрации в зависимости от давления иллюстрируется графиком на рис. 3. Упаривание растворов молочной кислоты в производственных условиях (давление 133 гПа) не сопровождается ее отгонкой с водяным паром. Однако при очень небольшом остаточном давлении и применении перегретого пара молочная кислота перегоняется и, обладая более высокой температурой кипения, чем вода, конденсируется раньше водяных паров.

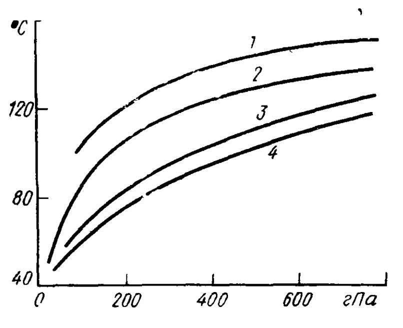


Рис. 3. Температура кипения растворов молочной кислоты в зависимости от внешнего давления и концентрации (% мас):
1 — 100°С, 2 — 85 °С; 3 — 65 °С, 4 — 45 °С.

Температура кипения молочной кислоты (безводной) в зависимости от внешнего давления приведена в табл. 8.

Таблица 8

Температура кипения и теплота испарения безводной молочной кислоты в зависимости от внешнего давления

Давление, гПа	Температура кипения, °С	Теплота испарения, кДж/кг	Давление, гПа	Температура кипения, °С	Теплота испарения, кДж/кг
1,73	90	1591	33,33	130	816
3,60	100	1231	55,99	140	812
8,80	110	1084	94,64	150	733
18,00	120	925	153,96	160	645

ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Оксикислотам как соединениям со смешанными функциями присущи одновременно все свойства кислот и спиртов. Карбоксильные и гидроксильные группы могут реагировать независимо одна от другой и в то же время оказывать взаимное влияние, что обусловливает особенности свойств оксикислот по сравнению с обычными карбоновыми кислотами и спиртами.

Свойства, зависящие от карбоксила

Электролитическая диссоциация. Это — свойство электролитов при растворении распадаться на разноименно заряженные ионы. Отношение числа диссоциированных молекул к общему числу молекул в растворе называется степенью диссоциации электролита и выражается в долях единицы или в процентах. Чем выше степень диссоциации, тем сильнее электролит.

Оксикислоты являются слабыми электролитами. Так как диссоциация их представляет собой обратимый процесс, ведущий к установлению равновесия между ионами и недиссоциированными молекулами, то она подчиняется закону действия масс. Для бинарных электролитов:

$$[H^+] \cdot [A^-]/[HA] = K_c,$$

где $[H^+]$, $[A^-]$ и $[HA]$ — концентрации соответственно катионов, анионов и недиссоциированных молекул; K_c — константа диссоциации.

Из уравнения видно, что чем больше K_c, тем сильнее диссоциирует электролит. Степень диссоциации слабых электролитов увеличивается с разбавлением и с повышением температуры. При постоянной температуре и определенном растворителе между константой диссоциации, степенью диссоциации α и концентрацией C электролита существует следующая зависимость (закон разбавления В. Оствальда):

$$K_c = \frac{\alpha^2}{1-\alpha} C.$$

Константа K_c называется концентрационной.

Так как закон действия масс основан на понятии «активная масса», не идентичном концентрации, то правильнее писать:

$$K_a = \frac{a_{H^+}a_{A^-}}{a_{HA}} = \frac{[H^+]\cdot[A^-]}{[HA]} \frac{f_{H^+}f_{A^-}}{f_{HA}},$$

где a_{H^+}, a_{A^-} и a_{HA} — активности соответственно ионов и молекул; f_{H^+}, f_{A^-} и f_{HA} — коэффициенты активности соответственно ионов и молекул.

Сущность понятия активность заключается в том, что не все ионы в растворе полностью свободны из-за электростатического притяжения между противоположно заряженными ионами.

Константа K_a называется термодинамической и не зависит от концентрации электролита. В справочниках и следующих таблицах 9—11 приведены термодинамические константы оксикислот в водных растворах, найденные по данным потенциометрического титрования и другим известным методам определения pH. При этом величина pH характеризует активность ионов водорода, а не их общую концентрацию.

При бесконечном разбавлении, когда растворы приближаются к идеальному состоянию, $K_c = K_a$. Величина K_a мала, поэтому по аналогии с выражением концентрации ионов водорода в растворе через символ pH для обозначения константы диссоциации пользуются символом $pK = -\lg K$. Очевидно, чем меньше величина pK, тем больше диссоциация, и наоборот.

В зависимости от числа карбоксилов в молекуле оксикислоты (основности) она диссоциирует в одну, две или три ступени. В частности, лимонная кислота диссоциирует в три ступени:

$$H_3Ci + H_2O \rightleftharpoons H_2Ci^{1-} + H_3O^{1+} \quad (K_1);$$

$$H_2Ci^{1-} + H_2O \rightleftharpoons HCi^{2-} + H_3O^{1+} \quad (K_2);$$

$$HCi^{2-} + H_2O \rightleftharpoons Ci^{3-} + H_3O^{1+} \quad (K_3),$$

где Ci — анион кислоты (цитрат); H_3O^{1+} — катион (гидратированный ион водорода, называемый ионом оксония), далее сокращенно обозначаемый H^{1+}, или H^+; K_1, K_2 и K_3 — соответственно константы 1, 2 и 3-й ступени диссоциации кислоты

Оксикислоты — значительно более сильные электролиты, чем родоначальные карбоновые кислоты, что объясняется I-эффектом гидроксила в насыщенной цепи углеродных атомов. По данным [95], для одноосновных пропионовой и α-оксипропионовой (рацемат) кислот при температуре 25 °C величины pK_a соответственно равны 4,873 ($K_a = 1{,}34\cdot10^{-5}$) и 3,860 ($K_a = 1{,}38\cdot10^{-4}$), т. е. для второй приблизительно на порядок больше. β-Оксипропионовая кислота имеет $pK_a = 4{,}523$ и $K_a = 3\cdot10^{-5}$; следовательно, величина K_a для нее примерно лишь в два с половиной раза больше, чем для α-пропионовой кислоты. Отсюда очевидно, что большее влияние на диссоциацию оказывает спиртовый гидроксил, находящийся в непосредственном соседстве с карбоксилом в α-положении.

По данным [107], D(—)-, L(+)- и D, L-молочные кислоты имеют одинаковую степень диссоциации, зависимость которой от температуры приведена в табл. 9.

Таблица 9

Диссоциация молочной кислоты

Температура, °C	pK_a	$K_a \cdot 10^4$	Степень диссоциации в 0,2M растворе, %
25	3,73	1,9	2,99
50	3,48	3,3	3,99
75	3,06	8,8	6,29
100	2,76	17,4	8,89

Таблица 10

Диссоциация винных кислот

Кислота	pK_1	pK_2
D-винная	2,93	4,23
L-винная	2,93	4,23
D, L-винная	2,96	4,24
Мезовинная	3,11	4,80

Константы диссоциации винных (двухосновных) кислот при температуре 25 °С (по Л. Физеру и М. Физеру) приведены в табл. 10. По другим данным, для D- и L-винной кислоты $pK_1 = 2{,}98—3{,}03$, $pK_2 = 4{,}34—4{,}37$; для мезовинной кислоты $pK_1 = 3{,}22$; $pK_2 = 4{,}82$.

По исследованиям И. Кольтгофа и Р. Боша лимонная кислота характеризовалась следующими значениями pK_a: для первой ступени диссоциации 3,086, для второй — 4,752, для третьей — 6,409 (при 18 °С). Более новые данные представлены в табл. 11 (по Р. Бейтсу и Г. Пинхингу).

Таблица 11

Диссоциация лимонной кислоты

Температура, °C	pK_1	pK_2	pK_3	Температура, °C	pK_1	pK_2	pK_3
0	3,220	4,837	6,393	30	3,116	4,755	6,406
5	3,200	4,813	6,386	35	3,109	4,751	6,423
10	3,176	4,797	6,383	40	3,099	4,700	6,439
15	3,160	4,782	6,384	45	3,097	4,754	6,462
20	3,142	4,769	6,388	50	3,095	4,757	6,484
25	3,128	4,761	6,396	—	—	—	—

Из данных табл. 9 и 11 следует, что с повышением температуры диссоциация молочной кислоты, первой и второй ступени лимонной кислоты возрастает, а диссоциация третьей ступени лимонной кислоты сначала незначительно повышается, а затем понижается.

Перечисленные выше кислоты по своей силе, определяемой в основном первой ступенью диссоциации, располагаются в следующий убывающий ряд:

D- и L-винные > D, L-винная > Мезовинная > Лимонная > Молочная.

При изучении комплексообразования, осаждения, растворения, гидролиза и других процессов, происходящих в растворах электролитов с участием слабых кислот, необходимо знание концентрационных констант диссоциации этих кислот. Разработан метод, позволяющий надежно рассчитать концентрацию $[H^+]$ по экспериментальным значениям pH [18].

При высокой ионной силе (мере интенсивности электрического поля, создаваемого ионами в растворе) концентрационные константы можно вычислить по следующим уравнениям:

для винной кислоты

$$pK_1 = 2,90 - \frac{\sqrt{\mu}}{1 + 1,6\sqrt{\mu}} + 0,16\mu;$$

$$pK_2 = 4,12 - \frac{\sqrt{\mu}}{1 + 1,6\sqrt{\mu}} + 0,42\mu - 0,07\mu^2;$$

для лимонной кислоты

$$pK_1 = 3,08 - \frac{\sqrt{\mu}}{1 + 1,6\sqrt{\mu}} + 0,23\mu;$$

$$pK_2 = 4,28 - \frac{2\sqrt{\mu}}{1 + 1,6\sqrt{\mu}} + 0,72\mu - 0,13\mu^2;$$

$$pK_3 = 5,32 - \frac{3\sqrt{\mu}}{1 + 1,6\sqrt{\mu}} + 1,39\mu - 0,26\mu^2,$$

где μ — ионная сила раствора, в данных опытах создаваемая перхлоратом натрия, в интервале $1 \leqslant \mu \leqslant 3,5$.

Свободный член в уравнениях представляет pK_a, найденный авторами экспериментально и согласующийся со средними величинами pK_a, приведенными выше для этих кислот по данным различных исследователей при температуре 25 °C. Расчет показывает, что с увеличением ионной силы раствора первые концентрационные константы обеих кислот значительно уменьшаются (рис. 4). При невысоких ионных силах концентрационные константы изменяются меньше. Например, при 25 °C при $\mu = 0$ и 0,1 они соответственно равны для винной кислоты $pK_1 = 3,9$ и 3,8, для лимонной кислоты $pK_1 = 3,1$ и 3,0, $pK_2 = 4,8$ и 4,4, $pK_3 = 6,4$ и 6,1.

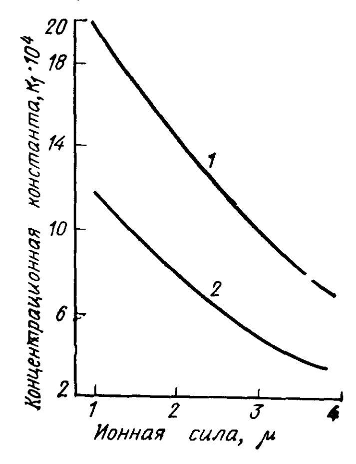


Рис. 4. Зависимость K_1 от величины μ:

1 — винной кислоты; *2* — лимонной кислоты.

Образование солей. Подобно обычным кислотам оксикислоты дают соли. В соответствии с основностью молочная кислота образует одну — среднюю соль, винная — кислую и среднюю, лимонная — две кислых и одну среднюю. Соли молочной кислоты называются лактатами (лат. acidum lacticum), D-винной — тартратами (acidum tartaricum), лимонной — цитратами (acidum citricum).

Лактат кальция — $Ca(C_3H_5O_3)_2$ образуется в производстве в результате сбраживания сахарсодержащих растворов молочнокислыми бактериями в присут-

ствии мела. Так как растворимость кальция с понижением температуры значительно понижается, то этим свойством пользуются в производстве для его выделения из сброженной среды. Лактат кальция кристаллизуется с пятью молекулами воды в форме мелких игл.

Из других солей молочной кислоты интересна малорастворимая, хорошо кристаллизующаяся цинковая соль — $Zn(C_3H_5O_3)_2$. Из водных растворов, содержащих один из изомеров, цинковая соль выделяется с двумя молекулами воды, из растворов рацемической кислоты — с тремя. Несмотря на небольшие растворимость и удельное вращение ($[\alpha] = 7{,}2°$) цинковых солей изомеров, поляриметрическим методом наряду с определением воды в кристаллогидрате пользуются для идентификации молочной кислоты. При этом учитывают, что направление вращения цинковых солей противоположно направлению вращения самих изомеров молочной кислоты.

Кислая калиевая соль винной кислоты $KHC_4H_4O_6$ трудно растворима в воде (табл. 12), еще меньше растворима в спиртовых

Таблица 12

Растворимость гидротартрата калия в воде

Температура, °С	Растворено, г/л	Температура, °С	Растворено, г/л	Температура, °С	Растворено, г/л
0	3,0	40	12,8	80	42,9
10	4,1	50	17,8	90	56,5
20	6,0	60	24,1	100	76,0
30	8,9	70	32,0	—	—

растворах, почему выпадает в осадок как в процессе приготовления вина, так и во время его выдержки. При температуре 20 °С в растворе, содержащем 5 % спирта, растворяется 3,8 г/л, в 17%-ном растворе — 2,1 г/л.

Чистый гидротартрат калия — бесцветные мелкие кристаллы ромбической системы. В зависимости от условий кристаллизации габитус кристаллов может изменяться и представлять собой пластинки в виде квадратов, шестиугольников и прямоугольников, частично усеченных с узких сторон. Он не содержит кристаллизационной воды, имеет относительную плотность 1,973 и константу диссоциации $4{,}55 \cdot 10^{-5}$. Так как на стенках и днищах бочек, бутов и цистерн винодельчеекых заводов гидротартрат калия образует плотный осадок, его называют еще винным камнем (tartari crudes). Поскольку винная кислота была найдена Шееле сначала в нем, то и за кислотой сохранилось название виннокаменная.

Чистый виннокислый кальций $CaC_4H_4O_6$ представляет собой мелкие ромбические (бисфеноидальные) кристаллы; при кристаллизации из нечистых растворов — порошок. Кристаллизуется с четырьмя молекулами воды, две из которых теряет при температуре

100 °С. Растворимость в воде значительно меньше, чем гидротартрата калия: при 25 °С — 0,436 г/л, при 100 °С — около 3.

Средняя калиевая соль $K_2C_4H_4 \cdot 0,5H_2O$ и кислая кальциевая соль $CaH_2(C_4H_4O_6)_2$ хорошо растворяются в воде.

Виннокислый калий—натрий (сеньетова соль) $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ при температуре 100 °С теряет три молекулы воды, при 130 °С — всю кристаллизационную воду. Имеет хорошую растворимость.

Из солей лимонной кислоты производственное значение имеет малорастворимая трехкальциевая соль $Ca_3(C_6H_5O_7)_2 \cdot 4H_2O$, в виде которой лимонную кислоту осаждают из ферментированных сахарсодержащих растворов. Растворимость в воде приведена в табл. 13 [20].

Таблица 13

Растворимость трехкальциевого цитрата в воде

pH раствора	Растворено цитрата, г/100 мл, при температуре, °С			
	60	70	80	90
6,0	0,0413	0,0365	0,0350	0,0323
7,0	0,0380	0,0355	0,0338	0,0265
7,5	0,0363	0,0310	0,0290	0,0235

Трехкальциевый цитрат имеет чрезвычайно мелкие кристаллы, напоминающие аморфную массу. Растворимость дикальциевого цитрата $CaH(C_6H_5O_7) \cdot 3H_2O$ по сравнению с растворимостью трехкальциевого примерно на порядок выше; растворимость монокальциевого цитрата по сравнению с дикальциевым имеет такую же зависимость.

Все оксикислоты способны давать растворимые хелатные комплексы с металлами, т. е. клешневидные комплексные циклические соединения, содержащие внутрисферные поликоординационные заместители, присоединенные к центральному атому металла за счет главной и побочной валентностей.

Хелаты могут иметь различное строение, например такое:

R, H, HC, O, CO, O, M, O, CO, O, CH, H, R

Состав хелатов зависит от pH среды.

Мерой стойкости хелатного комплекса является константа нестойкости K, которая в соответствии с законом действия масс выражается отношением произведения концентраций ионов реагирующих к концентрации образующегося комплексного иона. Чем меньше величина K, тем больше стойкость хелата. Например, для $FeCi \rightleftarrows Fe^{3+} + Ci^{3-}$ $K = 1,41 \cdot 10^{-12}$, а для $Cu(Tart)_4^{6-} \rightleftarrows Cu^{2+} +$

$+4Tart^{2-}$ $K=6{,}31\cdot10^{-7}$; стойкость первого из них больше второго. Обычно K выражают через $pK=-\lg K$. В соответствии с этим получим для FeCi $pK=11{,}85$, для $Cu(Tart)=6{,}20$. Очевидно, чем больше величина pK, тем больше стойкость хелата.

В табл. 14 приведены данные о стойкости хелатных комплексов оксикислот при температуре 20 °C и ионной силе 1,0 [93]. Следует учитывать, что приведенные в таблице числа являются логарифмами, поэтому увеличение их на одну единицу вызывает 10-кратное увеличение стойкости.

Таблица 14

Стойкость хелатных комплексов оксикислот

Кислота	pK комплекса с			
	Cu^{2+}	Fe^{2+}	Fe^{3+}	Ni^{2+}
Молочная	2,7	—	7,0	1,9
D-винная	6,5	4,8	12,0	5,4
D, L-винная	6,2	—	—	—
Лимонная	5,9	4,4	11,8	5,4

Образование сложных эфиров. При замещении гидроксила в карбоксильной группе остатком спирта образуются сложные эфиры, например метиловый эфир молочной кислоты:

$$CH_3{-}CH(OH){-}COOH + HO{-}CH_3 \rightarrow CH_3{-}CHOH{-}CO{-}O{-}CH_3 + H_2O.$$

В табл. VII—VIII приложения приведены физические константы важнейших эфиров молочной, винной и лимонной кислот.

Этерификация молочной и винной кислот, отгонка и омыление эфира используются в некоторых способах для получения этих кислот высокой чистоты.

Свойства, зависящие от спиртового гидроксила

В отличие от обычных кислот, оксикислоты способны окисляться. При осторожном окислении оксикислоты с вторичной спиртовой группой получаются кетонокислоты, например, из молочной кислоты — пировиноградная кислота:

$$CH_3{-}CH(OH){-}COOH \xrightarrow{+O} CH_3{-}CO{-}COOH + H_2O.$$

При замещении в спиртовом гидроксиле оксикислоты атома водорода остатком кислоты образуются сложные эфиры

$$CH_3COOH + HO{-}\underset{\displaystyle COOH}{\overset{\displaystyle CH_3}{\overset{|}{\underset{|}{C}}}}{-}H \rightarrow CH_3{-}CO{-}O{-}\underset{\displaystyle COOH}{\overset{\displaystyle CH_3}{\overset{|}{\underset{|}{C}}}}{-}H + H_2O,$$

а при замещении его радикалом — простые эфиры:

$$CH_3{-}OH + HO{-}\underset{COOH}{\overset{CH_3}{C}}{-}H \rightarrow CH_3{-}O{-}\underset{COOH}{\overset{CH_3}{C}}{-}H + H_2O.$$

Кроме того, оксикислоты со спиртами и кислотами могут давать дважды сложные эфиры, например молочная кислота с остатком уксусной кислоты и остатком метилового спирта:

$$CH_3{-}\underset{\parallel}{\overset{}{C}}{-}O{-}CH_3{-}CH{-}\underset{\parallel}{C}{-}OOCH_3.$$
$$\quad O \qquad\qquad\qquad O$$

Реакции, характерные только для оксикислот

При нагревании с разбавленной минеральной кислотой от α-оксикислот отщепляется муравьиная кислота и образуется соответствующий альдегид или кетон. Так, молочная кислота разлагается по реакции:

$$HO{-}\underset{COOH}{\overset{CH_3}{C}}{-}H \rightarrow H{-}C\begin{matrix}{}^{\nearrow O}\\ {}_{\searrow OH}\end{matrix} + CH_3{-}C\begin{matrix}{}^{\nearrow O}\\ {}_{\searrow H}\end{matrix}$$

Из лимонной кислоты наряду с муравьиной образуется ацетондикарбоновая кислота $COOH{-}CH_2{-}CO{-}CH_2{-}COOH$.

В результате нагревания L-винной кислоты в отсутствии минеральной кислоты до температуры 165 °C получаются в основном мезовинная и отчасти виноградная кислоты; при температуре 175 °C преобладает виноградная кислота; при температуре выше 175 °C или при 160—170 °C и давлении 106 гПа L-винная кислота превращается в метавинную кислоту — смолообразное гигроскопическое вещество желтого цвета. Дальнейшее повышение температуры приводит к образованию ангидрида — $C_4H_4O_5$, затем пировиноградной и пировинной (метилянтарной) кислот, уксусного альдегида, CO и CO_2.

При быстром пиролизе лимонной кислоты при температуре 170 °C и выше первоначальным продуктом дегидратации является аконитовая кислота, при разложении которой отгоняется смесь ангидридов цитраконовой и итаконовой кислот:

$$\begin{matrix}CH_2{-}COOH\\ |\\ C(OH){-}COOH\\ |\\ CH_2{-}COOH\end{matrix} \xrightarrow{-H_2O} \begin{matrix}CH_2{-}COOH\\ |\\ C{-}COOH\\ \parallel\\ CH{-}COOH\end{matrix} \xrightarrow[-H_2O]{-CO_2} \begin{cases}\begin{matrix}CH_3{-}C{-}CO\\ \parallel \qquad\quad \rangle O\\ CH{-}CO\end{matrix} \\ \begin{matrix}CH_2{-}CO\\ | \qquad\quad \rangle O\\ CH_2{=}C{-}CO\end{matrix}\end{cases}$$

Аконитовая кислота

Цитраконовый ангидрид

Итаконовый ангидрид

Молочная кислота в виду присутствия в ее молекулах одновременно карбоксила и спиртового гидроксила способна к взаимной этерификации. При этом из двух молекул кислоты образуется лактилмолочная кислота:

$$HO{-}\underset{}{\overset{CH_3}{\overset{|}{C}}}H{-}COOH + HO{-}\overset{CH_3}{\overset{|}{C}}H{-}COOH \rightarrow HO{-}\overset{CH_3}{\overset{|}{C}}H{-}CO{-}O{-}\overset{CH_3}{\overset{|}{C}}H{-}COOH + H_2O,$$

из трех молекул — дилактилмолочная кислота и т. д., вплоть до полилактилмолочной кислоты (табл. 15).

Таблица 15

Полимерогомологический ряд лактилмолочных кислот общей формулы $C_{3n}H_{4n+2}O_{2n+1}$

Член ряда	Эмпирическая формула	Молекулярная масса	Содержание молочной кислоты в лактилмолочных кислотах, %	Эфиросвязанная молочная кислота, %
1	$C_3H_6O_3$	90,08	100,00	0
2	$C_6H_{10}O_5$	162,14	111,11	50,0
3	$C_9H_{14}O_7$	234,21	115,38	66,6
4	$C_{12}H_{18}O_9$	306,27	117,65	75,0
5	$C_{15}H_{22}O_{11}$	378,34	119,05	80,0
6	$C_{18}H_{26}O_{13}$	450,40	120,00	83,3
7	$C_{21}H_{30}O_{15}$	522,46	120,69	85,7
. . .	. . .	. . .	. . .	. . .
100	$C_{300}H_{402}O_{201}$	7224,42	124,69	99,0

В растворах молочной кислоты концентрацией до 60 % из эфиросвязанной молочной кислоты содержится только лактилмолочная кислота. При больших концентрациях и повышении температуры до 100 °С образуется дилактилмолочная кислота. Более высокомолекулярные лактилмолочные кислоты не выделены.

Молочная кислота при длительном нагревании при 140—180 °С в вакууме (остаточное давление 13 гПа) в результате межмолекулярного отщепления воды образует 3,6-диалкил-1,4-диоксандион-2,5, называемый лактидом:

$$CH_3{-}CH(OH){-}C(=O)OH + HO{-}C(=O){-}CH(OH){-}CH_3 \xrightarrow{-2H_2O} \begin{matrix} & O & \\ H_3C{-}CH & & C{=}O \\ | & & | \\ O{=}C & & HC{-}CH_3 \\ & O & \end{matrix}$$

Следовательно, лактид — сложный эфир, отличающийся от лактилмолочной кислоты тем, что из двух молекул молочной кислоты выделяются две молекулы воды и образуется шестичленное кольцо.

Среди других продуктов превращения молочной кислоты с отщеплением воды найдены димолочная кислота и ее ангидрид:

$$\begin{array}{c} H_3C{-}CH{-}COOH \\ | \\ O \\ | \\ H_3C{-}CH{-}COOH \end{array} \quad ; \quad \begin{array}{c} H_3C{-}CH\,(OH){-}CO \\ | \\ O \\ | \\ H_3C{-}CH\,(OH){-}CO \end{array} .$$

По исследованиям Р. Эдера и Ф. Куттера, в 90—97 %-ной молочной кислоте содержится 39,6—59,0 % свободной молочной кислоты и 30,9—58,6 % лактилмолочной, дилактилмолочной и полилактилмолочной кислот, 1—4 % димолочной кислоты и ангидрида молочной кислоты и 0,14 % лактида. По Уотсону, в практически безводной молочной кислоте концентрацией 105 % содержится около 25 % свободной молочной кислоты и 80 % лактилмолочных кислот (выраженных в эквивалентах молочной кислоты).

Специфические реакции оксикислот и их солей

Для установления подлинности (идентификации) отдельных оксикислот пользуются следующими селективными реакциями.

Молочная кислота. 1. При действии окислителя, например раствора перманганата калия, в кислой среде молочная кислот выделяет ацетальдегид:

$$5CH_3CH\,(OH)\,COOH + 2KMnO_4 + 3H_2SO_4 \rightarrow 5CH_3CHO + K_2SO_4 + 2MnO_4 + $$
$$+ 5CO_2 + 8H_2O;$$
$$5\,[CH_3CH\,(OH)\,COO]_2\,Ca + 4KMnO_4 + 11H_2SO_4 \rightarrow 10CH_3CHO + 2K_2SO_4 + 4MnSO_4 +$$
$$+ 10CO_2 + 5CaSO_4 + 16H_2O.$$

Раствор молочной кислоты или лактата подкисляют серной кислотой, приливают раствор перманганата калия до красно-фиолетового окрашивания и нагревают. Выделяющийся ацетальдегид распознают по характерному запаху, а также по голубому окрашиванию с пиперазином и нитропруссидом натрия.

2. Слегка подщелоченные растворы лактатов образуют с раствором иода в иодиде калия желтый осадок иодоформа, распознаваемый по запаху, растворимости в эфире и по температуре плавления — около 120 °С.

3. Молочная кислота при нагревании с раствором хлоргидрата тирозина в 50 %-ной серной кислоте (0,1 г в 100 мл) образует оранжевую окраску.

Винная кислота. 1. Несколько капель раствора тартрата прибавляют к серной кислоте, предварительно смешанной с несколькими каплями раствора резорцина и бромида калия, и нагревают на водяной бане; если раствор охлаждают и выливают в воду, появляется синее окрашивание, переходящее в красное. Вместо резорцина и бромида можно пользоваться пирогаллолом или β-нафтолом (в первом случае появляется фиолетовая окраска, во втором — синевато-зеленая).

2. Нейтральные растворы тартратов с раствором нитрата серебра дают белый осадок тартрата серебра (свободная винная кислота осадка не дает). При растворении осадка в аммиаке и последующем нагревании на стенках пробирки выделяется металлическое серебро.

3. При добавлении к раствору винной кислоты или тартрата, подкисленного уксусной кислотой, одной капли раствора сульфата закисного железа, нескольких капель пероксида водорода и избытка гидроксида натрия возникает фиолетовое окрашивание.

4. К 1—10 %-ному раствору винной кислоты прибавляют небольшими порциями HgO, хранившийся под водой. Через 1—3 мин выпадает осадок, окрашенный в интенсивно желтый цвет.

Лимонная кислота. 1. Растворы лимонной кислоты подкисляют разбавленной серной кислотой, прибавляют несколько капель раствора перманганата калия и нагревают или некоторое время встряхивают до исчезновения окраски перманганата. Лимонная кислота, окисляясь, образует ацетондикарбоновую

кислоту. При добавлении брома в избытке ацетондикарбоновая кислота превращается в пентабромацетон (выпадающий в осадок)

$$\begin{array}{c} CH_2COOH \\ | \\ HO-C-COOH \\ | \\ CH_2COOH \end{array} \xrightarrow[-CO_2;\ -H_2O]{+O} \begin{array}{c} CH_2COOH \\ | \\ C=O \\ | \\ CH_2COOH \end{array} \xrightarrow{+5Br_2} \begin{array}{c} CHBr_2 \\ | \\ C=O \\ | \\ CBr_3 \end{array} + 2CO_2 + 5HBr.$$

На этих реакциях основан количественный спектрофотометрический метод определения лимонной кислоты в культуральных жидкостях Для этого осадок пентабромацетона растворяют в хлороформе и измеряют оптическую плотность в УФ-области спектра Очень важно, что этим методом учитывается и лимонная кислота, содержащаяся в виде солей (цитратов), которые при подкислении серной кислотой разлагаются

2. Цитраты с раствором сульфата окисной ртути нагревают до кипения. Получающимся раствором обесцвечивают раствор перманганата калия с образованием белого осадка состава

$$\begin{array}{c} O-Hg \\ Hg \qquad\quad SO_4 \\ O-Hg \end{array} + \begin{array}{c} CH_2-COO \\ | \\ C=O \qquad Hg. \\ | \\ CH_2-COO \end{array}$$

3 Несколько кристалликов цитрата смешивают с кристалликом антрахинона, 5 мл серной кислоты и осторожно нагревают При кипячении в течение 30 с появляется красное окрашивание.

ЧАСТЬ

2

ТЕХНОЛОГИЯ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

Глава 3. КУЛЬТУРА ASPERGILLUS NIGER — ПРОДУЦЕНТА ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

К. Вемер, открывший способность микроскопических грибов образовывать из сахара лимонную кислоту, считал, что он нашел новый род этих грибов, который назвал Citromyces и описал два вида — C. pfefferianus и C. glaber. Позднее К. Том установил, что эти грибы относятся к роду Penicillium, в связи с чем род Citromyces был упразднен. В 1913 г. В. Загродский доказал, что A. niger является наиболее активным продуцентом лимонной кислоты. Вемер не мог этого заметить, так как работал с питательной средой низкой кислотности, на которой образовывалась преимущественно щавелевая кислота.

В настоящее время для ферментации сахарсодержащих сред используют специальные штаммы A. niger. Имеются патенты на применение других видов Aspergillus и других родов, принадлежащих к различным классам микроскопических грибов: A. wentii, A. lichinensis, A. clavatus, A. foetidus, A. awamori, A. carbonarius, A. glaucus, A. fumaricus, A. cinnamoneus, A. aureus, A. lanosus, A. melleus, A. ochraceus, A. gorakphurensis; Penicillium luteum, P. janthinellum, P. restricum, P. adamentzii, P. arenarium, P. olivaceum, P. divaricatum, P. sunguiflaus, P. glaucum; Mucor piriformis; Trichoderma viride; Botrytis sp.; Nematospora corily и др.

A. wentii при конидиеобразовании приобретает желто-коричневый цвет. Он характеризуется четкими морфологическими признаками, отличающими его от A. niger и других плесеней. Отмечается, например, что A. wentii штамм NL 13/8 не требует предварительной очистки мелассы, добавления питательных солей или микроэлементов, в поверхностных условиях ферментирует среды, содержащие до 20 % сахара. Рекомендовано также применение смешанных культур, например A. niger и Mucor piriformis.

Tr. viride шт. АТСС 13233 обладает высокой амилазной и целлюлазной активностями и может ферментировать в лимонную кислоту непосредственно крахмал и другие полисахариды на жидких и твердых питательных средах.

Предложено применение в качестве продуцентов лимонной кислоты на сахарных и мелассных средах дрожжей Zygosaccharomyces mellis, Candida citroformans, Torulopsis ramosa, Rhodotorula glutinosus, Rh. rumra; бактерий Bacillus liheniformis, Arthrobacter terregens и других.

Cand. citroformans шт. Al 14530 не ферментирует фруктозу. На этом основании в Японии запатентован способ комбинированного производства из сахарозы (инвертированного сахара и мелассы) лимонной кислоты и фруктозы. Среду ферментируют, отделяют дрожжи и из культуральной жидкости осаждают лимонную кислоту в виде цитрата кальция; оставшуюся культуральную жидкость упаривают и гидроксидом или хлоридом кальция осаждают фруктозу в виде двойной соли, которую затем разлагают. Вместо указанного штамма Candida для ферментации глюкозы можно пользоваться A. niger шт. Al 7015 и

A. awamori Al 7135. Candida обычно требует добавления в среду солей свинца. Продолжительность ферментации ею по сравнению с A. niger сокращается вдвое, при исходном содержании сахара до 20 %. При использовании Rhodotorula, Nematospora, Zygosaccharomyces питательная среда может содержать до 28 % сахара и не требуется осаждения тяжелых металлов.

Для ферментации парафиновых питательных сред предложены дрожжеподобные грибы рода Candida (C. lipolitica, C. tropicalis и др.), бактерии Corynebacterium sp., мицелиальные грибы рода Penicillium и рода Aspergillus — A. elegans, A. auricomus. Недостатком большинства этих организмов является образование наряду с лимонной и изолимонной кислоты.

С производственной точки зрения A. niger и другие мицелиальные грибы имеют существенные недостатки: медленно растут, вследствие чего процесс накопления необходимого количества биомассы продолжителен; большая вязкость культуральной жидкости, переходящая в неньютоновскую область, затрудняет массообмен, в частности снабжение гриба кислородом воздуха, увеличивает расход энергии на перемешивание. Перспективным является поиск и селекция немицелиальных микроорганизмов — дрожжей, бактерий, которые не имеют отмеченных недостатков. Это особенно желательно для перевода процесса ферментации на непрерывно-проточный.

МОРФОЛОГИЯ ASPERGILLUS NIGER

Aspergillus niger относится к классу сумчатых грибов (Ascomycetes), семейству аспергилловых (Aspergillaceae), роду Aspergillus, который в настоящее время насчитывает свыше 120 видов. Тело гриба (рис. 5) состоит из бесцветных, сильно разветвленных и переплетенных между собой тонких нитей — гиф, образующих мицелий (грибницу). Гифы септированы — разделены поперечными перегородками (септами) на клетки. Диаметр гиф от 3 до 6 мкм.

Для аспергиллов характерен поверхностный стелющийся рост, однако при достаточной аэрации и строгом соблюдении асептики они могут размножаться и в толще твердой и в глубине жидкой среды.

При поверхностном росте возвышаются органы плодоношения — конидиеносцы, которые отходят от особых опорных клеток мицелия. Конидиеносцы представляют собой утолщенные неветвящиеся несептированные, сильно зернистые на вид гифы длиной до 2000 мкм и более. На концах конидиеносцев появляется перетяжка без перегородки, выделяющая «пузырек» будущей головки. Пузырек округляется, увеличивается до 400 мкм, на его поверхности вырастают радиально расположенные продолговатые одно- или двухрядные клетки — стеригмы. На свободных концах стеригм размещаются цепочками более мелкие клетки — конидии. Такое строение головки внешне похоже на наконечник лейки, из отверстий которого льются струйки воды. Отсюда русское название аспергилла — леечный гриб. Однако точный перевод термина аспергилл — «косматая голова».

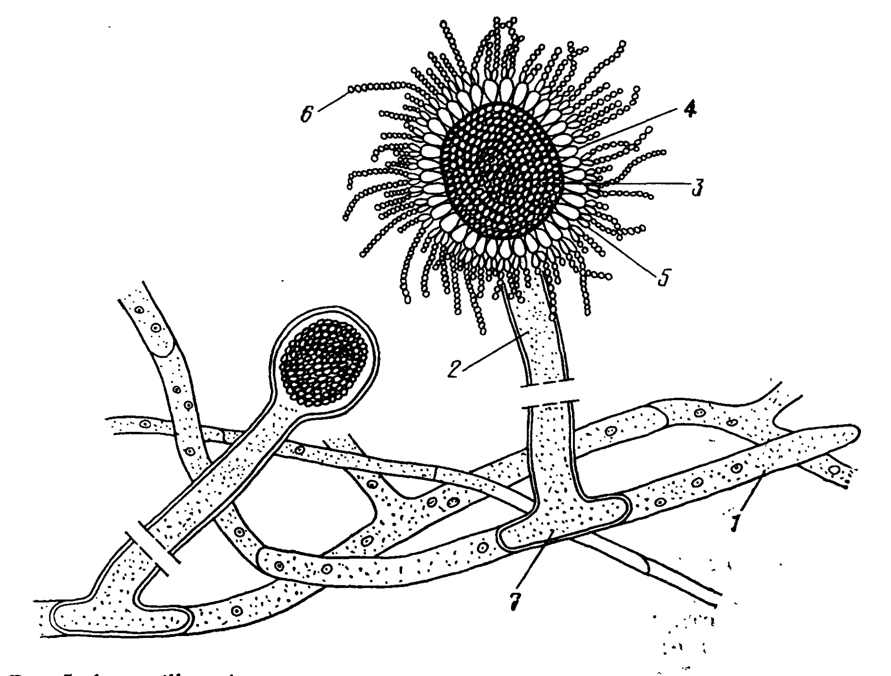


Рис. 5. Aspergillus niger:

1 — гифы; 2 — конидиеносец; 3 — пузырек; 4 — стеригмы первого ряда; 5 — стеригмы второго ряда; 6 — конидии; 7 — опорные клетки.

Конидии — покоящиеся клетки, с минимальным содержанием воды, шаровидной или элипсовидной формы, средним размером в поперечнике 4 мкм. Поверхность конидий — гладкая, бугристая или шиповатая, черная (откуда и название этого гриба niger) или коричневая с различными оттенками. Окраска конидий определяет цвет всей конидиеносящей поверхности. Число конидий на каждой головке достигает 10 тысяч.

Зрелые конидии очень легко отделяются от головок током воздуха или струей воды. Попав в жидкую питательную среду, они сначала набухают, а затем прорастают, образуя одновременно один или два проростка (гифы), на твердой среде прорастают при наличии капельно-жидкой влаги, почти не набухая. Гифа растет на свободном конце; удлиняясь, дает боковые отростки, которые в свою очередь также удлиняются, ветвятся, переплетаются между собой, образуя колонии, видимые невооруженным глазом. Через 16—20 ч в центральной гифе начинают появляться обособленные клетки, из которых вырастают конидиеносцы. Образование зрелых конидий заканчивается через 3—4 суток.

Рассмотренный способ размножения A. niger называется бесполым. Вообще же аспергиллы могут размножаться и половым путем — посредством асков, образующихся в плодовых телах. Однако развитие плодовых тел A. niger прекращается на самой

ранней стадии и недоразвитые плодовые тела превращаются в плотные скопления сплетенных гиф (склероции). Многие штаммы A. niger склероций не образуют. Гриб может размножаться и вегетативным путем — отделившиеся от гиф частицы способны самостоятельно расти и образовывать новый мицелий.

Клетка аспергиллов состоит из оболочки (клеточной стенки) и протопласта. Клеточная стенка сформирована из полисахаридов, в основном хитина, и небольшого количества белков, липидов и полифосфатов. После удаления клеточной стенки в осмотически уравновешенной среде протопласт сохраняет основные свойства и обмен веществ клетки. В протопласте различают цитоплазму (протоплазму) и ядро. Поверхность цитоплазмы покрыта цитоплазматической мембраной, прилегающей к клеточной стенке. Она представляет собой типичную липопротеидную трехслойную мембрану, в которой локализованы многие ферменты. Цитоплазматическая мембрана полупроницаема и выполняет важную роль в обмене веществ между клеткой и окружающей средой.

Цитоплазма — коллоидная вязкая прозрачная масса. Матрикс (основное вещество) цитоплазмы содержит очень тонкие нитевидные структуры различной длины и рассеянные гранулы, состоящие из белков, липидов, углеводов и нуклеиновых кислот. Из гранул присутствуют рибосомы и митохондрии. Первые представляют собой мелкие сферические частицы, состоящие почти из одной рибонуклеиновой кислоты (РНК), ответственные за синтез белка; вторые являются местом локализации дыхательных ферментов, в них происходят энергетические процессы и синтез веществ, обладающих большим запасом энергии, например аденозинтрифосфата.

Кроме этих образований в цитоплазме содержатся такие включения как гликоген, волютин и жир, являющиеся запасными питательными веществами.

В грибных клетках имеется от одного до нескольких ядер, отделенных от цитоплазмы мембраной. Ядра состоят из ядрышка и хромосом, содержащих дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) — материальный носитель наследственности.

ТРЕБОВАНИЯ К ПРОДУЦЕНТАМ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

При использовании любого вида сырья наряду с оптимальными составом питательной среды и режимом ферментации эффективность производства определяется применяемым штаммом A. niger. Штаммы для производства лимонной кислоты должны отвечать следующим основным требованиям: 1) давать возможно больший выход лимонной кислоты к массе введенного в производство сахара и быстро его ферментировать; 2) быть генетически однородными; 3) обладать устойчивостью к внешним воздействиям; 4) иметь обильное конидиеношение.

Выход лимонной кислоты зависит от относительных затрат сахара на образование лимонной кислоты, побочных кислот, син-

тез биомассы гриба и дыхание, а также от полноты ассимиляции сахара. Очевидно, чем меньше остается сахара в культуральной жидкости в конце процесса ферментации и чем больше его идет на образование лимонной кислоты, при уменьшении других затрат, тем выше продуктивность штамма. Немаловажное значение имеет и повышение скорости ферментации.

В штаммах A. niger, полученных с помощью мутагенных факторов, с течением времени возникают обратные мутации. Более устойчивы штаммы, полученные ступенчатой селекцией. Обратные мутации, как правило, затрагивают продуктивность по лимонной кислоте. Поэтому необходимо, чтобы этот основной признак в процессе селекции был достаточно закреплен.

Химический состав мелассы подвержен сильным колебаниям, мало изучено влияние отдельных ее компонентов, особенно содержащихся в очень небольших количествах, но, по-видимому, в ряде случаев оказывающих решающее влияние на метаболизм гриба, в связи с чем еще недостаточно умело подготавливаются питательные среды. При такой ситуации требование устойчивости штамма к внешней среде становится одним из первостепенных.

Уровень конидиеношения (урожай конидий) не имеет прямого отношения к ферментации, но влияет на производительность станции по приготовлению посевного материала и стоимость его.

Поскольку условия поверхностного и глубинного культивирования A. niger имеют большое различие, в каждом из этих способов обычно применяют свои штаммы. Лишь некоторые глубинные штаммы могут быть использованы в поверхностной культуре. На выбор штамма, кроме способа ферментации, оказывает влияние состав питательной среды, концентрация в ней сахара, электролитов, буферных веществ, исходная величина pH и rH_2. Например, штамм 6/5, предназначенный для поверхностной ферментации сахарных (сахарозных) сред, малопригоден для мелассных сред. Остальные показатели состава питательной среды тесно связаны с методами ее подготовки и проведения ферментации. Желательно иметь коллекции живых штаммов, адаптированных к мелассам различного технологического качества.

Штаммы A. niger, применявшиеся в начале развития отечественного производства лимонной кислоты, по-видимому, были недостаточно устойчивыми к мелассным средам концентрацией 12—15 % (по сахару), поэтому использовался так называемый накопительный способ, согласно которому начальная концентрация среды составляла 2—3 %. При такой начальной концентрации среда имела pH около 7 и невысокую буферность, что способствовало накоплению нужного количества мицелия и быстрому началу образования лимонной кислоты. По ходу ферментации проводили подливы более концентрированной мелассной среды и доводили суммарную концентрацию ее в расчете на цикл до 12—13 % (по сахару).

Несмотря на то что в настоящее время селекционированные штаммы A. niger способны ферментировать мелассные среды с

начальной концентрацией около 12 %, отечественный способ ферментации сохранился в своих основных чертах благодаря ряду преимуществ.

Некоторые способы глубинной ферментации предусматривают использование A. niger в виде гранул и насыщение среды не воздухом, а кислородом. В этом случае штамм гриба должен обладать склонностью к гранулированию, образовывать гранулы определенного размера.

ИЗМЕНЧИВОСТЬ И СЕЛЕКЦИЯ

Микроорганизмы, так же как и другие живые существа, обладают наследственностью — свойством воспроизводить подобных себе в ряду поколений. Наследственность определяется генотипом, т. е. совокупностью генов, каждый из которых обладает присущей только ему биохимической функцией.

Гены состоят из макромолекул ДНК. Нуклеотид образуется молекулами азотистого основания (аденина, гуанина и пиримидинов — тимина, цитозина), пентозы (дезоксирибозы) и ортофосфорной кислоты. Отдельные нуклеотиды соединены между собой дифосфодиэстерными связями в полимер, представляющих собой спирально закрученные нити. Спирали — двухнитчатые, в виде винтовой лестницы, пуринаденин одной спирали всегда соединен водородными связями с тимином другой спирали, а гуанин — с цитозином. Такие пары нуклеотидов в различных ДНК находятся в определенном количестве и расположены в определенной последовательности, отчего зависят и свойства генов в пределах генотипа. Любые наследственные изменения влияют на порядок чередования нуклеотидов или выпадение некоторых из них.

Так как белки синтезируются в цитоплазме, то информация сюда доставляется с помощью РНК, отличающейся от ДНК тем, что ее спираль однонитчатая, содержит не дезоксирибозу, а рибозу, а из пиримидинов — урацил. Эта РНК называется также информационной матричной. Информация с какого-либо участка ДНК «переписывается» на молекулу и-РНК и направляется в цитоплазму клетки, где и образуется молекула нужного белка по соответствующему плану. Существует еще транспортная РНК, переносящая аминокислоты к месту синтеза белка.

В производстве встречаются не с одной особью микроорганизма, а с совокупностью особей определенного вида, называемой популяцией. В результате влияния неучитываемых естественных факторов в ней происходит спонтанная мутация — генотипические необратимые изменения. В очень больших популяциях (10^{15}—10^{17} клеток), несмотря на малую частоту мутаций (10^{-10} на ген), даже за одну генерацию может появиться 10^5—10^7 мутантных клеток по каждому гену (Н. С. Печуркин). Следовательно, свойства популяции в целом не идентичны свойствам отдельной особи, популяция содержит разнокачественные клетки. Частота мутаций в тысячи и сотни тысяч раз возрастает при ее индуцировании мутагенами — факторами физической, химической и биологической природы.

Известно несколько методов селекции микроорганизмов, находящихся на разном уровне совершенства. Наиболее старый из них основан на повторном выделении из производственных сред

полезных форм. Несмотря на то, что в ряде случаев этим методом удается повысить эффективность штаммов, нельзя полагаться на медленно идущие процессы спонтанного мутирования. Многократными пересевами микроорганизмов на среды, например мелассные, с постепенно увеличивающейся концентрацией сухих веществ или ингибиторов, т. е. адаптацией и отбором, можно получить устойчивые осмофильные штаммы и штаммы, приспособленные к мелассе низкого качества.

Более перспективен метод мутагенеза — искусственного отбора измененных форм, индуцированных мутагенами [84]. К физическим мутагенам относятся ультрафиолетовые лучи, ионизирующие излучения — рентгеновские и γ-лучи различной жесткости, корпускулярные излучения типа быстрых электронов, позитронов, протонов, α-частиц, нейтронов, ультразвук и др. Эти мутагенные факторы или непосредственно повреждают молекулу ДНК или приводят к деструктивным процессам, возникающим под действием образующихся свободных радикалов. Интересно отметить, что из 27 различных видов испытанных грибов самыми толерантными (наиболее сопротивляющимися) УФ-облучению оказались конидии A. niger. Это объясняется их черным цветом, который выполняет защитные функции, поглощая значительную часть энергии УФ-лучей.

Химические мутагены в зависимости от механизма действия подразделяют на ингибиторы предшественников нуклеиновых кислот, аналоги азотистых оснований, алкилирующие соединения, окислители, восстановители, свободные радикалы, акридиновые красители, некоторые антибиотики и др.

Ингибиторы предшественников нуклеиновых кислот (азагуанин, азасерин, кофеин, теобромин), являясь аналогами естественных субстратов, присоединяются к активным центрам ферментов, блокируя основную их функцию — синтез пуриновых и пиримидиновых оснований. Аналоги азотистых оснований (5-бромурацил, 5-хлорурацил, 2-аминопурин) встраиваются в нуклеиновые кислоты вместо пуриновых и пиримидиновых оснований.

Алкилирующие соединения (диметилсульфат, диэтилсульфат, окись пропилена, формальдегид, фенол) присоединяются к азотистому основанию ДНК, ослабляют цепь ДНК, в результате чего из молекулы ДНК может выпасть то или иное основание. В последние годы Институтом химической физики АН СССР открыты более сильные мутагены, названные «супермутагенами». К ним принадлежат производные N-нитрозосоединений, в частности, нитрозонитрометилгуанидин и нитрозометилмочевина, которые алкилируют цитозин, вызывая его замену тимином, извращают синтез предшественников ДНК, дезаминируют некоторые основания.

Азотистая кислота дезаминирует азотистые основания, окисляя группу NH_2 до азота и изменяя строение вновь синтезированной ДНК. К окислителям относятся иод, металлы переменной валентности, кислород, пероксиды. Акридиновые красители вклиниваются между пурин-пиримидиновыми парами двойной спирали ДНК, в результате чего нить ДНК удлиняется. Кроме того, акридиновые красители способны присоединяться к отрицательно заряженным фосфатным группам нуклеиновых кислот.

Недавно установлено, что на конидии A. niger мутагенное действие оказывает сахарин в концентрации 3—7 мг/мл. К биологическим мутагенам относятся фаги.

При воздействии мутагенами выживает лишь часть конидий, для остальных оно заканчивается летальным исходом. Количество

выживших конидий зависит от природы мутагена, энергичности и времени воздействия. Среди выживших находятся варианты особей как с повышенной (плюс) активностью, так и с пониженной (минус), причем последних оказывается больше.

Сильное влияние на изменчивость оказывает генотип организма и особенно у организмов, уже подвергшихся мутированию. Частота возникновения как плюс-, так и минус-вариантов с увеличением дозы мутагена возрастает, но до определенного уровня, после чего резко падает. Максимальная частота возникновения минус-вариантов достигается при дозе, соответствующей максимальной частоте появления морфологических вариантов, тогда как максимальная частота плюс-вариантов наступает раньше и при меньших дозах. Низкая частота возникновения плюс-вариантов у высокоактивных штаммов объясняется насыщением генома мутациями, что снижает эффект мутагенных факторов [5].

При мутагенезе изменяется фенотип — общий комплекс морфологических признаков и физиолого-биохимических свойств микроорганизмов, что является как бы внешним проявлением генотипа. Так, в результате мутационного процесса у A. niger — продуцента лимонной кислоты появляются варианты с цветом колоний, варьирующим от коричневого и бежевого до зеленого и желтого [29].

Мутанты, полученные индуцированной изменчивостью, направленной на повышение продуктивности по лимонной кислоте, иногда медленнее развиваются, снижают урожай конидий, менее устойчивы к неблагоприятным условиям внешней среды; скорость образования ими лимонной кислоты может вначале отставать, а затем опережать исходный штамм. Все это связано с изменением способности к синтезу тех или иных ферментов или их относительной активностью.

У различных штаммов A. niger неодинаково нарушается биологическое окисление — одна из особенностей наследственных изменений. У A. niger с развитой гидролитической способностью снижается эндогенное дыхание, у A. niger — продуцента лимонной кислоты, наоборот, оно возрастает на 20—25 %. Под влиянием УФ-облучения уязвимой оказывается система фосфорного обмена и содержание фосфора во всех составных частях гриба возрастает. Между биохимической активностью данного мутанта и его морфологическими признаками в ряде случаев наблюдается коррелятивная связь. Поиск активных форм среди морфологических мутантов скорее может привести к цели, чем проверка активности всех вариантов, выросших из мутированных конидий [5].

Чтобы полнее реализовать новые полезные формы микроорганизма, необходимо более глубоко изучать его физиологию и биохимию и вносить изменения в состав питательной среды и условия культивирования по сравнению с исходным штаммом. Было показано, что A. niger мутант Т-1, полученный из штамма 6/5 нуждается в аминокислотах [34], штамм Л-1 отрицательно реагирует на содержание растворенного кальция в среде и требует усиленной аэрации.

Хорошо известно, что структура микроорганизма строится на основании информации, получаемой им по наследству, и трансформируется под влиянием окружающей среды. К сожалению, при дальнейшей селекции высокопродуктивных штаммов A. niger для производства лимонной кислоты роли питательной среды и других условий культивирования не всегда уделялось должное внимание, а следовательно, не в полной мере вскрывались потенциальные возможности, заложенные в каждом новом штамме. Более того, селекция микроорганизмов — продуцентов органических кислот, образование которых связано с энергетическим обменом, менее эффективна, чем селекция продуцентов вторичных продуктов метаболизма (антибиотиков, ароматических веществ и др.). Решающего сдвига в повышении продуктивности штамма можно добиться подбором соответствующих условий культивирования [5].

Маловероятно, что успешная селекция методом мутагенеза может продолжаться бесконечно долго уже потому, что количество генов, поддающихся мутации, ограничено. Это заставляет применять и другие методы, в частности, гибридизацию.

Гибридизация (скрещивание) присуща только микроорганизмам, имеющим половой процесс. Вегетативная гибридизация, в генетическом отношении подобная половому процессу, у грибов была открыта в 1953 г. Г. Понтекорво. Сущность ее заключается в том, что генетический материал обменивается в результате клеточного слияния — парасексуального цикла. Для того чтобы протопласты клеток могли свободно слиться, необходимо удалить оболочки клеток без ущерба для их целостности и выживания, что достигается с помощью полиэтиленгликоля или ферментных препаратов.

Парасексуальный цикл состоит из нескольких следующих один за другим этапов (рис. 6) [10]. Сначала происходит соединение гиф, расположенных вблизи двух различных штаммов гриба с образованием между ними цитоплазматических мостиков, называемое анастомозом. Полученный гетерокарион в смешанной цитоплазме несет генетически неизменные ядра обоих штаммов. Затем в мицелии гетерокариона гаплоидные ядра двух типов сливаются и образуются одно гетерозиготное — диплоидное ядро. В ходе митоза (деления) диплоидного ядра могут возникать как гаплоидные, так и диплоидные рекомбинанты.

Методом вегетативной гибридизации A. niger пока не получено диплоида более продуктивного образователя лимонной кислоты, чем известного, но, учитывая сложность и трудность этого пути, его нельзя считать безнадежным.

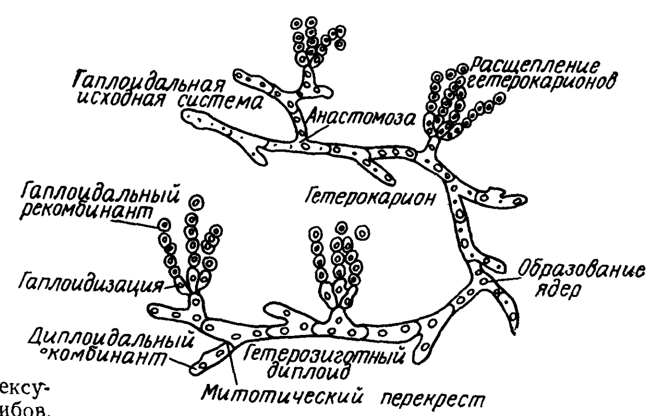


Рис. 6. Схема парасексуального цикла у грибов.

Диплоидизацию можно использовать также как источник нового исходного материала для селекции с помощью искусственной индукции. Такой материал особенно пластичен и пригоден для воздействия мутагенных средств [101].

Самым новым методом является генная инженерия. В селекции A. niger — продуцента лимонной кислоты она еще не применялась.

Родительскими штаммами A. niger в отечественном производстве лимонной кислоты были: 6/5, 90 и 82. Штамм 6/5 получен из сборного штамма в коллекции Института сельскохозяйственной микробиологии ВАСХНИЛ путем многократного выделения активных клеток. Он использовался в производстве лимонной кислоты поверхностным способом на сахарной синтетической среде. Для ферментации мелассной среды применялся штамм, полученный с завода лимонной кислоты в Казнееве (ЧССР), который внесен в коллекцию под № 90. Для глубинной ферментации мелассной среды служил штамм коллекции ВНИИКП под № 82.

Работа по повышению продуктивности обоих штаммов проводилась методом индуцированной изменчивости. Так, в 1963 г. последовательной двухступенчатой обработкой конидий A. niger штамм 90 этиленимином и УФ-лучами с выделением после каждой из них эффективных вариантов был получен штамм ЭУ-119 [33]. В дальнейшем из него было селекционировано несколько штаммов, например, ступенчатым воздействием нитрозометилмочевиной, нитрозонитрометилгуанидином, диазоацетилбутаном, диэтилсульфатом, ультрафиолетовым и гамма-облучением [16].

В настоящее время по данным исследователей невозможно воссоздать точную динамику нарастания продуктивности селекционированных штаммов, так как ее оценка проводилась на мелассе различного качества (к тому же сильно изменившегося в течение прошедшей четверти века) и в неодинаковых условиях ферментации. В табл. 16 приведены сравнительные данные, характеризующие кислотообразование некоторыми поверхностными штаммами на среде, приготовленной из мелассы одного образца среднего качества в одинаковых условиях ферментации (по В. М. Голубцовой).

Таблица 16

Характеристика кислотообразования поверхностными штаммами A. niger

Штаммы	Выход лимонной кислоты, % к массе сахара	Съем лимонной кислоты		Продуктивность единицы массы мицелия	
		г/(м²·сут)[1]	% к контролю	г/г	% к контролю
ЭУ-119 (контроль)	67±2	1620±30	100,0	5,5	100
НММ-331	73±1	1770±20	109,2	—	—
Р-1	72±1	1740±40	107,4	6,1	111
Гамма-1	77±1	1850±20	114,1	7,0	127
317	77±1	1850±20	114,1	7,1	129

[1] Количество лимонной кислоты, полученное за цикл (г), разделенное на продолжительность ферментации (сут) и отнесенное к единице площади (1 м²) кюветы.

Сейчас в производственных условиях применяется штамм Р-3. Многие из вновь селекционированных штаммов хорошо растут на питательных средах из мелассы любого качества и образуют больше лимонной кислоты по сравнению со штаммом ЭУ-119, дают большой урожай конидий, которые базируются на коротких конидиеносцах (при сборе конидий они меньше засоряются мицелиальными элементами).

Под руководством Е. Я. Щербаковой (ЛНИИПП) УФ-облучением конидий глубинного штамма 82 в 1961 г. получен первый мутант 288, который продуцировал около 56 % лимонной кислоты к массе сахара при 30 % побочных кислот в сумме органических кислот. Последующим УФ-облучением был получен более активный штамм 288/9, показавший выход лимонной кислоты 65 % при относительном содержании 27 % побочных кислот. В семидесятые годы комбинированным воздействием УФ-лучей и нитрозометилмочевины селекционирован штамм Ленинградский-1 (Л-1), обеспечивший выход лимонной кислоты около 78 % при относительном содержании 12 % побочных кислот. Большой интерес представляет селекционирование штаммов, не образующих щавелевой кислоты.

ФЕРМЕНТНАЯ СИСТЕМА ASPERGILLUS NIGER

Общие свойства ферментов

Все жизненные проявления микроорганизмов обусловлены химическими реакциями, осуществляемыми с помощью ферментов (энзимов) — катализаторов белковой природы. Для них характерна специфичность и обратимость действия, катализирование реакций в строго запрограммированной последовательности. Аспергиллы, как и другие микроскопические грибы, питаются органическими соединениями, и естественная среда их обитания очень разнообразна (почва, овощи, плоды, активный ил и др.), поэтому они обладают особенно мощной ферментной системой (в нее входит свыше 50 индивидуальных ферментов).

Ферменты локализованы в различных частях клетки и связаны с ее структурными элементами неодинаково прочно. Например, ферменты цикла трикарбоновых кислот сосредоточены преимущественно в митохондриях, где они тесно взаимодействуют с ферментами дыхательной цепи и окислительного фосфорилирования. Исключение составляют НАДФ (никотинамидадениндинуклеотидфосфат) — специфическая изоцитратдегидрогеназа, аконитаза и фумараза, находящиеся в растворимой части цитоплазмы. Гликолитические ферменты, наоборот, локализованы только в последней.

Одни из ферментов — экзоферменты, главным образом гидролитические, легко выделяются во внешнюю среду с целью расщепления высокомолекулярных веществ (крахмала, клетчатки, белков, жиров и проч.) до более простых, усваиваемых грибом, другие — эндоферменты более крепко связаны, действуют внутри

клетки, осуществляя дальнейшее превращение этих веществ, в том числе и синтез компонентов клетки. Лишь по мере старения и начинающегося автолиза в среду выделяются и эндоферменты.

Различают также ферменты конститутивные и адаптивные, или индуцибельные. Первые всегда находятся в клетках данного организма, вторые вновь образуются или образование их резко усиливается соответствующим субстратом, на который действует данный фермент.

По своему строению ферменты делят на простые белки (протеины) и сложные (протеиды). Протеиды содержат группу небелковой природы. Белковую часть называют также ферон (носитель), апофермент; небелковую группу — простетическая группа, агон (активная группа), кофермент. Обычно под простетической группой понимают группу, прочно связанную с белком, под коферментом — группу, которая может отделяться от него, устойчивую к нагреванию. В ферментах — протеидах ни одна из частей в отдельности не обладает каталитической активностью. Простыми белками являются, в частности, гидролазы, большинство же ферментов — сложные белки.

Роль коферментов играют различные витамины или соединения, образованные с их участием (кофермент А, НАД — никотинамидадениндинуклеотид и др.), HS-глютатион (пептид γ-глютаминцистеинглицин), нуклеотиды и их производные, растворимые рибонуклеиновые кислоты, фосфорные эфиры моносахаридов и других веществ, в некоторых случаях и металлы, важные для каталитической активности.

Активным центром ферментов-протеинов являются радикалы (остатки) некоторых аминокислот, например серина, гистидина, триптофана, и он проявляется, когда белковая молекула приобретает присущую ей третичную структуру. Во всех ферментах выделяют еще два центра: субстратный и аллостерический. Первый из них выполняет функцию присоединения субстрата к ферменту. Существенную роль в этом играют функциональные группы ($—COOH$, $—CHOH$, $—NH_2$, $—NH$, $—SH$ и др.), ответвляющиеся от пептидной цепи и не участвующие в построении пептидной связи. Второй (аллостерический) центр представляет собой участок молекулы фермента, в результате присоединения к которому определенного низкомолекулярного вещества (эффектора) изменяется структура белковой молекулы, что приводит к увеличению или уменьшению каталитической активности фермента.

В основе механизма действия ферментов лежит образование промежуточных субстрат-ферментных комплексов. При этом происходят деформации, облегчающие вступление субстрата в реакцию. После совершения реакции фермент и химически измененный субстрат расходятся, и регенерированный фермент способен к образованию новых комплексов с субстратом. Для того чтобы произошло соединение субстрата с ферментом, необходимо определенное соответствие между строением субстрата и активного центра. Сущность катализа заключается в снижении энергии акти-

вации, т. е. той энергии, которая необходима для совершения химической реакции. Изменение скорости реакций, катализируемых ферментами, зависит от многих условий.

В отличие от неорганических катализаторов ферменты очень термолабильны, поэтому с повышением температуры, увеличивающей число активных молекул, скорость реакций возрастает лишь до определенной температуры, называемой оптимальной. При температуре выше оптимальной происходит денатурация белковой части фермента — изменение нативной конформации, сопровождающееся снижением или полной потерей каталитической активности (инактивацией). Температурный оптимум для разных микробных ферментов неодинаков и лежит обычно в пределах 40—50 °С. Активность ферментов зависит и от pH среды, оптимальная величина которого также неодинакова для разных ферментов. Активная концентрация водородных ионов влияет на ионизацию активного центра фермента, субстрата, субстрат-ферментного комплекса, на структуру белковой молекулы.

Как отмечалось, действие ферментов определяется и специфическими активаторами и ингибиторами, называемыми эффекторами, или модификаторами. Катионы многих металлов (магния, железа, цинка, кобальта, калия и др.) активируют некоторые ферменты. Такое действие объясняется тем, что в одних случаях они входят в состав простетических групп ферментов, в других — способствуют образованию субстрат-ферментного комплекса или же действуют иными путями. Особенно сильное действие оказывают активаторы, которые, присоединяясь к аллостерическому центру фермента, трансформируют структуру белковой молекулы так, что субстратный и каталитический центры фермента приобретают наиболее эффективную конфигурацию (комплементарность).

Ингибиторы затормаживают действие ферментов. Некоторые ингибиторы действуют конкурентно: будучи сходными по химическому строению и расположению электронов с субстратом, соединяются с ферментом, мешая в этом субстрату. Таким ингибитором является, например, малоновая кислота, ингибирующая действие сукцинатдегидрогеназы. При неконкурентном торможении ингибитор, соединяясь с белковой частью или с простетической группой, блокирует (связывает) активные группы или входящие в их состав металлы. Ингибитор, связываясь с аллостерическим центром, искажает его структуру, что может передаваться субстратному активному центру и частично экранировать его. Катионы тяжелых металлов — серебра, ртути, свинца, мышьяка — являются ядами для всех ферментов. К неконкурентным ингибиторам относятся цианиды, оксид углерода и некоторые другие.

Действие неорганических ионов весьма многообразно. Часто оно зависит от их концентрации в среде: при одной концентрации (обычно небольшой) они выступают как активаторы ферментов, при другой — как ингибиторы. Активируя какой-то фермент, они могут ингибировать один или несколько других ферментов. Например, цианиды стимулируют действие протеаз и одновременно

блокируют дыхательные ферменты. Среди ионов наблюдается антагонистическое действие. Так, растворимая аденозинтрифосфатаза (АТФ-аза) активируется ионами магния и угнетается ионами кальция. Ион натрия иногда действует как ингибитор ферментов, активируемых ионами калия. Катионы Na^+, K^+, Rb^+, Cs^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Cr^{3+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Al^{3+}, NH_4^+, как правило, активируют один, реже два фермента и не являются взаимозаменяемыми. Только Mg^{2+} активирует многие киназы и лигазы и почти всегда может быть заменен на Mn^{2+}.

Конечный, а иногда и промежуточный продукт многостадийного процесса анаболизма (синтеза) или катаболизма (распада) может служить аллостерическим ингибитором одной из начальных реакций или, как говорят, действовать по принципу отрицательной обратной связи (ретроингибирование). Большинство регуляторных ферментов ингибируется по этому принципу.

В A. niger содержатся представители всех шести классов ферментов. В покоящихся конидиях многие ферменты отсутствуют и начинают выявляться лишь спустя определенное время. Синтез тех или иных адаптивных ферментов является функцией состава среды.

Оксидоредуктазы

Этот класс включает ряд разнообразных ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции. Все они инактивируются цианидом и сульфидом водорода.

Дегидрогеназы катализируют отщепление и перенос атомов водорода, или электронов. Молекула вещества окисляется, если теряет свой атом водорода, или электрон, и восстанавливается, если приобретает чужой атом водорода, или электрон. Дегидрогеназы — двухкомпонентные ферменты, коферментом в них служат НАД или НАДФ, флавинадениндинуклеотид (ФАД) или флавинмононуклеотид (ФМН). Дегидрогеназы, связанные с НАД (НАД-зависимые), принимают участие главным образом в процессах дыхания, т. е. переносе водорода (электронов) от субстратов к кислороду. НАДФ-зависимые дегидрогеназы участвуют преимущественно в переносе водорода от субстратов, образующихся в результате катаболических реакций, к восстановительным реакциям биосинтеза.

Водород от НАД передается на ФАД, а от него в цитохромную систему (железопорфириновых ферментов), в которой и завершается окисление. Последний цитохром, реагирующий с молекулярным кислородом, называется цитохромоксидазой. При акцепции водорода кислородом образуется вода, а при акцепции электронов — анион радикала O_2^-. Установлено, что ФАД и ФМН более активно синтезируются у медленнорастущих штаммов A. niger, характеризующихся замедленным конидиеобразованием и укороченными конидиеносцами.

Дегидрогеназы окисляют многие субстраты, например, малатдегидрогеназа — яблочную кислоту, изоцитратдегидрогеназа — изо-

лимонную, глютаминдегидрогеназа — глютаминовую, глюкозодегидрогеназа — глюкозу, альдегиддегидрогеназы — различные альдегиды и т. д. Первые две реакции входят в цикл трикарбоновых кислот. При действии малатдегидрогеназы яблочная кислота превращается в щавелевоуксусную:

$$\text{яблочная кислота} + \text{НАД} \rightleftharpoons \text{щавелевоуксусная кислота} + \text{НАД}\cdot H_2.$$

Фермент строго специфичен к L-яблочной кислоте. Конкурентно ингибируется фтороксалоацетатом и фтормалатом. Последний может образовываться в присутствии фторацетата (фторацетил-КоА под действием малатсинтетазы реагирует с глиоксилевой кислотой).

При действии изоцитратдегидрогеназы изолимонная кислота сначала окисляется в щавелевоянтарную:

$$\text{изолимонная кислота} + \text{НАДФ} \rightleftharpoons \text{щавелевоянтарная кислота} + \text{НАДФ}\cdot H_2,$$

которая затем в результате декарбоксилирования превращается в α-кетоглутаровую кислоту. Изоцитратдегидрогеназа является аллостерическим регуляторным ферментом, активностью которого лимитируется скорость всего цикла трикарбоновых кислот. Фермент активируется ионами магния или марганца. Аденозиндифосфорная кислота (АДФ) стабилизирует его, аденозинтрифосфорная кислота (АТФ) и НАД$\cdot H_2$ ингибируют, что может быть объяснено как конкуренцией с НАД, так и образованием хелатных комплексов с ионами магния и марганца, необходимыми в качестве кофакторов. По данным [86], оксаломалат в концентрации 1 ммоль полностью подавляет активность изоцитратдегидрогеназы; глиоксилат (0,025 ммоль) ингибирует лишь косвенным путем — через свои производные с пируватом и с оксалоацетатом.

Согласно [114] изоцитратдегидрогеназа A. niger имеет оптимум действия при pH 8,0 (рис. 7). α-Кетоглутаратдегидрогеназа, катализирующая превращение α-кетоглутаровой кислоты в сукцинил-КоAS, активируется Mg^{2+}, ингибируется арсенитом.

Сукцинатдегидрогеназа катализирует окисление янтарной кислоты в фумаровую. Фермент активируется ионами двухвалентного железа, фосфатом, конкурентно ингибируется малоновой кислотой, этилиодацетатом и следами щавелевоуксусной кислоты. В цикле трикарбоновых кислот фосфорорганические инсектициды и малоновая кислота в малых концентрациях (меньше 0,01 моля), особенно последняя, являются высокоспецифичным ингибитором этого фермента. Связываясь с активным центром фермента вместо янтарной кислоты, они не подвергаются каким-либо превращениям и при добавлении даже небольших количеств (90 мкг/л) весь цикл подавляют. Действие малоновой кислоты снимается АТФ, хотя и не полностью (синтез лимонной кислоты все же ниже).

При гликолизе глицеральдегидфосфатдегидрогеназа с участием НАД и субстратного (неорганического) фосфата окисляет 3-фосфоглицериновый альдегид до 1,3-дифосфоглицериновой кислоты.

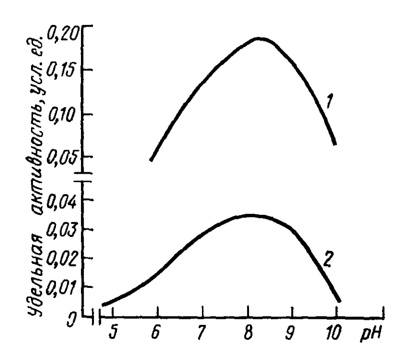


Рис. 7. Активность аконитатгидратазы (*1*) и изоцитратдегидрогеназы (*2*) и зависимости от величины pH.

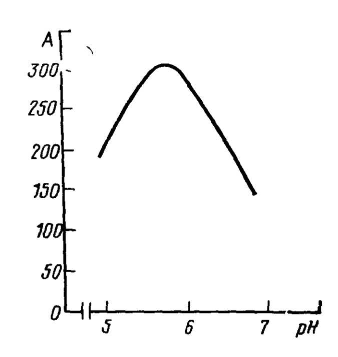


Рис. 8. Оптимум действия глюкозооксидазы при 30 °C:
А — потреблено O_2 за 30 мин, мм³.

Оксидазы катализируют перенос водорода непосредственно на молекулу кислорода. Представителем оксидазы является полифенолоксидаза, катализирующая перенос электронов и протонов от фенолов (гидрохинона, пирокатехина, пирогаллола). В результате окисления образуются темноокрашенные хиноновые соединения. Фермент тирозиназа окисляет аминокислоту тирозин с образованием также темноокрашенных соединений, называемых меланинами.

К оксидазам флавопротеинового типа (кофермент — ФАД) относится и глюкозооксидаза, катализирующая окисление глюкозы. Она энергично окисляет β-D-глюкозу, незначительно маннозу и галактозу, не окисляет дисахариды.

Реакция окисления идет по следующей схеме:

```
 ┌────────┐                          ┌─────────┐          O
HO—C—H    │                         O=C        │          C//
   |      │                            |       │          |  \OH
 H—C—OH   │                          H—C—OH    │        H—C—OH
   |      │                            |       │          |
HO—C—H    O + ФАД → ФАД·H2 +        HO—C—H     O + H2O → HO—C—H
   |      │                            |       │          |
 H—C—OH   │                          H—C—OH    │        H—C—OH
   |      │                            |       │          |
 H—C──────┘                          H—C───────┘        H—C—OH
   |                                   |                  |
  CH2OH                               CH2OH              CH2OH
```

Сначала у первого атома углерода молекулы глюкозы отнимается два атома водорода, при этом кофермент восстанавливается, а из глюкозы образуется β-D-глюконо-δ-лактон. Затем ФАД·H_2 реагирует с кислородом воздуха, в результате чего получается пероксид водорода. Последний токсичен для живых клеток, поэтому он немедленно расщепляется каталазой на кислород и воду. Из β-D-глюконо-δ-лактона спонтанно образуется глюконовая кислота.

Оптимум действия глюкозооксидазы A. niger находится при pH 5,8 (рис. 8), изоэлектрическая точка — при pH 4,4. Активность глюкозооксидазы тормозится гидроксиламином, гидразином, фенилгидразином, димедоном и гидросульфитом натрия. Торможение HS-ядами (парахлормеркурийбензоатом) является конкурентным по отношению к глюкозе. Ионы Ca^{2+}, NH_4^+, Cl^- обладают как активирующим, так и стабилизирующим действием (по отношению к HS-ядам). Отмечается, что глюкозооксидаза обладает антибиотическим действием, хотя механизм действия ее продолжает оставаться не вполне выясненным.

Пероксидаза и каталаза — двухкомпонентные ферменты. Активная группа их имеет одинаковое строение и содержит трехвалентное железо, соединенное с остатками четырех пиррольных колец в виде гематина. Различие в каталитической функции этих ферментов объясняется разными свойствами белков в этих ферментах, связанных с одинаковой активной группой. Пероксидаза катализирует окисление различных органических соединений типа AH_2 перекисью водорода по схеме

$$AH_2 + H_2O_2 \rightarrow A + 2H_2O.$$

Каталаза катализирует распад пероксида водорода на воду и молекулярный кислород:

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2.$$

Активная каталаза накапливается в первой стадии развития гриба, главным образом в течение первых суток после посева конидий, при ферментации снижается. В культуральной жидкости каталаза отсутствует. Добавление меди в среду, содержащую катионы железа, марганца и цинка, стимулирует рост мицелия и биосинтез каталазы (М. А. Дрбоглав и В. А. Кирсанова).

Трансферазы

Трансферазы — ферменты, катализирующие перенос целых атомных группировок от одного органического соединения к другому. Например, в процессе гликолиза под действием фосфотрансфераз осуществляется перенос остатков фосфорной кислоты от АТФ на глюкозу, фруктозу, галактозу, глюкозамин, например:

Глюкоза + АТФ → Глюкозо-6-фосфат + АДФ.

К глюкозо-6-фосфату с помощью фосфотрансферазы может присоединяться еще один остаток фосфорной кислоты, который она получает от новой молекулы АТФ. Первая фосфотрансфераза получила название гексокиназа, вторая — фосфогексокиназа (в условиях гликолиза — фосфофруктокиназа). Все киназы нуждаются в катионе двухвалентного металла (Mn^{2+}, Zn^{2+}, обычно Mg^{2+}), в которых они играют роль кофактора.

Реакция превращения фруктозо-6-фосфата в фруктозо-1,6-дифосфат характерна для гликолитической цепи реакций, а катализирующий ее фермент фосфофруктокиназа относится к ферментам, определяющим скорость гликолиза. Высокие концентрации АТФ резко ингибируют фермент; АДФ и АМФ, наоборот, активируют его. Гликолиз блокируется также цитратом (2—10 ммоль); небольшие концентрации АТФ (0,1—0,5 ммоль) и фруктозо-6-фосфата (0,5—2 ммоль) не усиливают ингибирующего действия цитрата (А. Габисон).

Под действием пируваткиназы с участием АДФ фосфоенолпировиноградная кислота превращается в пировиноградную кислоту и АТФ. Ион кальция конкурирует с ионами магния и марганца, образуя с ферментом неактивный комплекс. Необходимы также катионы щелочных металлов K^+, Pb^+ или Cs^+ (антагонисты — Na^+ и Li^+).

Трансферазы могут переносить и большие группы, например, глюкозилтрансфераза и пентозилтрансфераза переносят остатки моносахаридов (гексоз, пентоз) на другие молекулы и таким образом участвовать в синтезе новых молекул углеводов. Трансгалактозидаза A. niger катализирует образование полисахарида галактозамина; трансфруктозидаза — фруктозосодержащие олигосахариды.

Реакция переаминирования происходит также с участием трансфераз. При перенесении NH_2-группы с глютаминовой кислоты на пировиноградную кислоту образуются α-кетоглутаровая кислота и аланин:

$$\begin{array}{c} COOH \\ | \\ H—C—NH_2 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ COOH \end{array} + \begin{array}{c} CH_3 \\ | \\ C=O \\ | \\ COOH \end{array} \rightleftarrows \begin{array}{c} COOH \\ | \\ C=O \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ COOH \end{array} + \begin{array}{c} CH_3 \\ | \\ H—C—NH_2 \\ | \\ COOH \end{array}.$$

Амидинотрансферазы переносят амидную группу, ацилтрансферазы — ацильные остатки карбоновых кислот и т. д.

Гидролазы

Гидролазы катализируют гидролиз (иногда синтез) сложных соединений с участием воды (в первом случае вода присоединяется, во втором — выделяется). К классу гидролаз принадлежат эстеразы, карбогидразы, амидазы и пептидазы

Эстеразы катализируют расщепление и образование сложноэфирных связей. Под действием липазы жиры распадаются на глицерин и свободные жирные кислоты. Таназа катализирует гидролиз танина — сложного эфира ароматических кислот с фенолами или углеводами. Таназу образуют многие грибы, среди которых A. niger — наиболее активный ее продуцент. Она относится

к адаптивным ферментам, так как образуется только при содержании в среде танина или продукта ее распада — галловой кислоты.

Пектинэстераза (пектаза) катализирует расщепление растворимого пектина — сложного эфира полигалактуроновой кислоты и метилового спирта. Дальнейшую деструкцию полигалактуроновой кислоты (разрыв β-1,4-связей между остатками галактуроновой кислоты осуществляет другой фермент — полигалактуроназа (пектиназа):

Пектиназа

COO^- $COO \cdot CH_3$ $COO \cdot CH_3$

Пектаза

Около 90 % пектолитических ферментов секретируется в культуральную жидкость, что послужило основанием для разработки методов их извлечения. Оптимум действия пектолитических ферментов находится в слабокислой среде. Они активируются ионами кальция и магния. Фосфатазы катализируют гидролиз сложных эфиров фосфорной кислоты. Различают монофосфатазы (фосфомоноэстеразы), дифосфатазы и полифосфатазы.

Монофосфатазы катализируют отщепление фосфорной кислоты от соединений типа

$$R{-}O \,\vdots\, {-}\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{P}}{-}OH. \quad (\text{P}{-}OH)$$

$$R{-}O \,\vdots\, {-}\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{P}}}}{-}OH.$$

К такому типу соединений принадлежат фосфорные эфиры сахаров: глюкозо-1-фосфат, глюкозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-дифосфат и некоторые другие. В соответствии с этим ферменты называют: глюкозо-1-фосфатаза, глюкозо-6-фосфатаза, гексозодифосфатаза и т. д. К монофосфатазам принадлежит и фитаза, отщепляющая фосфорную кислоту от инозитфосфорной кислоты.

Дифосфатазы катализируют гидролиз диэфиров фосфорной кислоты в соединениях типа

$$R{-}O \,\vdots\, {-}\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{P}}}}{-} \,\vdots\, O{-}R_1.$$

К таким соединениям относятся рибонуклеиновая и дезоксирибонуклеиновая кислоты. Расщепляющие их ферменты носят название соответственно рибонуклеаза (РНК-аза) и дезоксирибонуклеаза (ДНК-аза). Следует заметить, что РНК-аза по новой номенклатуре помещена в класс трансфераз, так как под действием этого фермента происходит перенос фосфатного остатка с образованием циклических фосфатов.

Полифосфаты катализируют отщепление фосфорной кислоты от полифосфатов:

$$R{-}O{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{\underset{\underset{\displaystyle OH}{|}}{P}}{-}O{-}\ \vdots\ {-}\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{\underset{\underset{\displaystyle OH}{|}}{P}}{-}OH.$$

В A. niger присутствуют как неорганические, так и органические полифосфаты. К последним относится АТФ, в котором, как и в неорганических полифосфатах, все три остатка фосфорной кислоты соединены последовательно один за другим. При отщеплении третьего остатка фосфорной кислоты АТФ превращается в АДФ и освобождается необходимая клетке энергия. Обратный процесс — присоединение к АДФ фосфорной кислоты сопровождается аккумулированием энергии. Особенно богаты энергией вторая и третья связи фосфорной кислоты (макроэргические связи). Как уже указывалось, фермент, отщепляющий фосфорную кислоту от АТФ, называется аденозинтрифосфатаза (АТФ-аза).

Неорганические полифосфаты регулируют в клетке уровень АТФ и АДФ. Обмен неорганических фосфатов с системой АДФ — АТФ осуществляет фермент полифосфаткиназа. Возможно, что в A. niger содержится одна фосфатаза, действие которой изменяется в зависимости от субстрата и других условий. Фосфатазы подавляются ионами кальция, цинка и магния при pH 3—5 и активируются магнием при pH выше 6. Они подавляются также фторидом, азидом и слабо — цианидом.

Карбогидразы катализируют гидролиз и синтез гликозидов (ди-, три- и полисахаридов). Действие карбогидраз направлено на гликозидные связи между остатками моносахаридов Карбогидразы разделяют на олигазы и полиазы.

Олигазы: глюкозидаза, галактозидаза, фруктофуранозидаза α-Глюкозидаза расщепляет α-глюкозидную связь в дисахаридах и глюкозидах, например в молекуле мальтозы, причем образуются две молекулы глюкозы. β-Глюкозидаза расщепляет β-глюкозидную связь в целлобиозе и гентиобиозе, в глюкозидах — амигдалине, арбутине и др. α-Галактозидаза расщепляет α-гликозидную связь в раффинозе и мелибиозе. A. niger не содержит α-галактидазы или активность ее не проявляется в процессе ферментации. β-Фруктофуронозидаза (сахараза, инвертаза) катализирует расщепление сахарозы на глюкозу и фруктозу (инвертированный сахар). Фермент гидролизует также трисахарид раффинозу, представляющий собой α-галактозидо-сахарозу:

α-D-галактоза α-D-глюкоза β-D-фруктоза

Мелибиоза Сахароза

При этом от молекулы раффинозы отщепляется фруктоза. Учитывая сказанное выше относительно α-галактозидазы в A. niger, при ферментации в производстве лимонной кислоты раффиноза так же, как и при спиртовом сбраживании мелассных сред, используется лишь на одну треть.

A. niger содержит очень активную инвертазу, которая накапливается в мицелии на первых стадиях развития гриба. Инвертаза выделяется в среду и особенно сильно при автолизе мицелия. Максимальная активность фермента зависит от pH среды и несколько различается для разных штаммов (находится в пределах 2,5—3,5) (рис. 9). У высокопродуктивных кислотообразователей активность инвертазы меньше, чем у низкопродуктивных [35]. При наличии в среде катионов марганца, железа, меди добавление цинка повышает синтез инвертазы в мицелии; при наличии в среде катионов цинка, марганца и меди добавление железа стимулирует синтез инвертазы в мицелии, но снижает содержание инвертазы в культуральной жидкости. Наиболее высокая активность инвертазы в мицелии была в присутствии в среде катионов меди, железа и цинка.

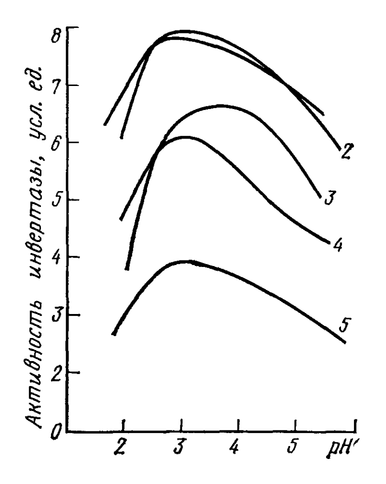


Рис. 9. Активность инвертазы A. niger в зависимости от величины pH:
1—5 — номера различных штаммов.

Полиазы: амилаза, целлюлаза, гемицеллюлаза, инулаза. Каждая из них имеет собирательное название и состоит из ряда родственных ферментов, отличающихся характером действия на субстрат. В микроскопических грибах содержится α-амилаза и глюкоамилаза, гидролизующие крахмал до сбраживаемых сахаров, что дало повод рекомендовать использование отработавшего мицелия для осахаривания крахмала в разваренной зерно-картофельной массе спиртового производства. Однако вследствие иного направления селекции A. niger в производстве лимонной кислоты активность амилазы оказалась небольшой.

К конститутивным ферментам A. niger относятся целлюлаза и гемицеллюлаза, гидролизующие соответствующие субстраты до ди- и олигосахаридов. В результате расщепления, например, целлюлозы образуется целлобиоза. Инулаза, по-видимому, является адаптивным ферментом. Оптимум действия комплекса целлюлозолитических ферментов находится при 30 °С и pH 5—6.

Определенной активностью обладают ферменты, участвующие в гидролизе хитина — ацетамидного производного целлюлозы, служащего одним из основных полимерных компонентов клеточных стенок грибов. Гидролиз в хитине β-глюкозидных связей начинает хитиназа, заканчивает его на стадии образования ацетилглюкозамина хитобиаза.

Амидазы катализируют гидролиз амидов с образованием аммиака и кислоты:

$$R{-}CO{-}NH_2 + H_2O \rightarrow R{-}COOH + NH_3.$$

Уреаза катализирует расщепление мочевины:

$$CO(NH_2)_2 + H_2O \rightarrow CO_2 + 2NH_3.$$

3 Зак 1816

Аспарагиназа и глютаминаза катализируют расщепление аспарагина и глютамина соответственно до аспарагиновой и глютаминовой кислот и аммиака, например:

$$\underset{\text{Аспарагин}}{NH_2—CO—CH_2—CH(NH_2)—COOH} + H_2O \rightarrow \underset{\text{Аспарагиновая кислота}}{HOOC—CH_2—CH(NH_2)—COOH} + NH_3.$$

Аргиназа катализирует гидролиз L-аргинина с образованием орнитина и мочевины. Дезаминазы пуриновых оснований катализируют отщепление аммиака от пуриновых оснований (аденина и гуанина) как свободных, так и входящих в состав более сложных соединений.

Пептидазы — протеолитические ферменты (протеазы), катализирующие гидролитическое расщепление пептидной связи (—CO—NH—) в белках и пептидах по типу:

$$R—CO—NH—R_1 + H_2O \rightarrow R—COOH + R_1—NH_2.$$

Пептидазы имеют ярко выраженную специфичность действия. Все их можно объединить в две основные группы: эндо- и экзопептидазы. Первые разрывают пептидные связи только внутри полипептидной цепи и расщепляют макромолекулу белка на отдельные фрагменты, вторые — с карбоксильного или аминного конца фрагментов, отщепляя аминокислоты одну за другой. Пептидазы группы A. niger относятся к так называемым «кислым», проявляющим свою активность при pH 2,0—3,5. Протеолитическая активность A. niger в роде аспергиллов самая низкая — около 20 усл. ед. (при изменении в других видах от 180 до 1240 усл. ед.).

Лиазы

Лиазы — ферменты, катализирующие отщепление от субстратов негидролитическим путем отдельных групп с образованием двойной связи или, наоборот, присоединение групп по месту разрыва этой двойной связи. В результате реакций нередко выделяются CO_2, NH_3, H_2O и другие простейшие продукты. Некоторые из реакций обратимы.

Дегидратазы (гидратазы) катализируют реакции дегидратирования и гидратирования органических соединений.

Фосфопируватгидратаза, или енолаза, катализирует обратимую реакцию, играющую важную роль в процессе гликолиза — превращение 2-фосфоглицериновой кислоты в фосфоенолпировиноградную кислоту:

$$\text{2-Фосфоглицериновая кислота} \underset{-H_2O}{\overset{+H_2O}{\rightleftarrows}} \text{Фосфоенолпировиноградная кислота}.$$

Для действия фермента необходимо присутствие Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+} или Cd^{2+} (с этими ионами енолаза предварительно образует комплекс). Ингибиторами могут быть ионы кальция, железа и фосфора.

Аконитатгидратаза — фермент, обеспечивающий равновесие в системе:

$$\text{Лимонная кислота} \underset{+H_2O}{\overset{-H_2O}{\rightleftarrows}} \text{Цис-аконитовая кислота} \underset{-H_2O}{\overset{+H_2O}{\rightleftarrows}} \text{Изолимонная кислота.}$$

В равновесной смеси при pH 7 и температуре 25 °С содержится 91 % лимонной кислоты, 6 % изолимонной и 3 % цис-аконитовой. Аконитатгидратаза A. niger имеет оптимум действия при pH 8,3 (см. рис. 7 на с. 60). Она, по-видимому, обладает абсолютной специфичностью к своим субстратам. Активируется и стабилизируется Fe^{2+} и цистеином, конкурентно ингибируется фторцитратом, трансаконитатом, оксаломалатом и глиоксилатом, неконкурентно — пероксидом водорода, гексацианоферроатом и ионами двухвалентной меди.

При добавлении в среду пероксида водорода, по данным Е. Брухмана, выход лимонной кислоты в процессе ферментации возрастает. Он возрастает также при добавлении бутилгидроперекиси, хинонов и метанола, приводящих к накоплению пероксида водорода. Такую же роль играют ингибиторы каталазы (цианамид, нафтохинонсульфокислоты) или ионы меди и цинка, способствующие образованию пероксида водорода. Предполагается, что сильные штаммы A. niger проявляют слабую пероксидазную активность.

Фумаратгидратаза (фумараза) катализирует обратимую реакцию гидратации фумаровой кислоты с образованием яблочной кислоты.

Аспартатаммиаклиаза катализирует обратимую реакцию синтеза аспарагиновой кислоты из фумаровой кислоты и аммиака.

Декарбоксилазы катализируют отщепление диоксида углерода от α-кето- и аминокислот. Так, пируватдекарбоксилаза расщепляет пировиноградную кислоту на уксусный альдегид и диоксид углерода; оксалоацетатдекарбоксилаза — щавелевоуксусную кислоту на пировиноградную кислоту и диоксид углерода. Наиболее сильным ингибитором декарбоксилаз является арсенит; конкурентно ингибирует фторпируват.

К этому классу ферментов относится также альдолаза, катализирующая распад фруктозо-1,6-дифосфата на 3-фосфоглицериновый альдегид и фосфодиоксиацетон. Для проявления активности альдолазы необходимы ионы двухвалентных металлов и калия.

Изомеразы

Изомеразы катализируют внутримолекулярные превращения некоторых органических веществ в их изомеры. Так, фосфоглюкозоизомераза катализирует взаимное превращение глюкозо-6-фосфата и фруктозо-6-фосфата, триозофосфатизомераза — превращение 3-фосфоглицеринового альдегида и фосфодиоксиацетона. Фосфоглюкозоизомераза обладает высокой специфичностью,

и действие ее не нуждается в присутствии ионов магния или марганца.

Ферменты, катализирующие внутримолекулярный перенос отдельных групп, называют мутазами. К ним, в частности, относится фосфоглицеромутаза, катализирующая обратимое превращение 3-фосфоглицериновой и 2-фосфоглицериновой кислот. Для протекания реакции необходим магний.

Лигазы

Лигазы (синтетазы) — ферменты, катализирующие синтез органических соединений из исходных веществ, активированных за счет энергии распада АТФ.

Среди лигаз находятся ацил-КоА-синтетазы, катализирующие присоединение остатков карбоновых кислот $\left(R{-}C{\overset{O}{\lessgtr}}\right)$, например, ацетила, малонила, сукцинила и др. к коферменту А (КоА). Последний состоит из остатков пантотеновой кислоты, аденозина, тиоэтаноламина и трех остатков фосфорной кислоты, содержит сульфгидрильную группу (—SH), являющуюся его активным центром. Например, образование ацетил-КоА из уксусной кислоты и КоА под действием фермента ацетил-КоА-синтетазы происходит сопряженно с распадом АТФ по уравнению:

$$CH_3COOH + \text{КоASH} + \text{АТФ} \rightarrow CH_3CO\,\text{КоAS} + \text{АМФ} + \text{Пирофосфат}.$$

При взаимодействии ацетил-КоА со щавелевоуксусной кислотой, ацетильный остаток КоА переносится на щавелевоуксусную кислоту, в результате чего образуется лимонная кислота:

$$\text{Щавелевоуксусная кислота} + \text{Ацетил-КоА S} \xrightarrow{+H_2O} \text{Лимонная кислота} + \text{КоASH}.$$

Реакция катализируется конденсирующим ферментом — цитратсинтетазой.

Цитратсинтетаза относится к регуляторным ферментам. Это чрезвычайно устойчивый фермент с очень крупной молекулой; специфичность к ацетил-КоАS и оксалоацетату близка к абсолютной. Он может реагировать еще только с монофторацетил-КоА. В присутствии оксалоацетата монофторацетил-КоА превращается во фторцитрат с очень небольшой скоростью. Ингибируется АТФ и $НАДН_2$.

Карбоксилазы при участии АТФ катализируют присоединение диоксида углерода к органическим кислотам. Например, пируваткарбоксилаза катализирует синтез щавелевоуксусной кислоты из диоксида углерода и пировиноградной кислоты:

$$\begin{matrix}\text{Пировиноградная}\\ \text{кислота}\end{matrix} + \text{АТФ} + H_2O + CO_2 \rightarrow \begin{matrix}\text{Щавелевоуксусная}\\ \text{кислота}\end{matrix} + \text{АДФ} + H_3PO_4.$$

Карбоксилазы в качестве простетической группы содержат биотин; ингибируются веществами, связывающими SH-группы, и для их действия необходимы ионы магния и калия.

Лигазы катализируют синтез амидов из аминокислот и аммиака; при участии аспарагинсинтетазы и глютаминсинтетазы образуются соответственно аспарагин и глютамин. Лигазы играют важную роль в процессе биосинтеза белка.

Глава 4. УСЛОВИЯ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ ASPERGILLUS NIGER

ПИТАНИЕ

Жизнедеятельность A. niger проявляется в процессах питания, дыхания, роста и в реакциях на внешние раздражения. Питание и дыхание, необходимые организму для синтеза клеточного вещества и получения энергии, являются основой метаболизма (обмена веществ).

По типу питания аспергиллы относятся к гетеротрофным организмам, усваивающим углерод из органических соединений. Поступление в клетку растворенных в воде веществ происходит путем диффузии и осмоса через всю поверхность тела и регулируется цитоплазматической мембраной. Таким образом организм отбирает из окружающей среды необходимое питание.

Вследствие полупроницаемости цитоплазматической мембраны через нее свободно проникают в основном молекулы растворителя (воды). При этом главной движущей силой диффузии является разность концентраций веществ в окружающей среде и в цитоплазме клетки (перенос по градиенту концентрации) — пассивная диффузия. Большинство других веществ проходит через мембрану благодаря специальной системе переноса, находящейся в мембране и состоящей из белков-переносчиков и ферментов пермеазы, катализирующих связь субстрата с белком-переносчиком. При участии пермеаз осуществляется перенос одних веществ по градиенту концентрации — облегченная диффузия, других — против него — активный транспорт. В первом случае диффузия происходит без затраты энергии, во втором при переносе каждой молекулы субстрата затрачивается одна молекула АТФ (О. И. Колешко).

По сравнению с автотрофами аспергиллы имеют клетки, проницаемые для веществ большей молекулярной массы и обладающие высоким осмотическим давлением (осмотрофы). Питательная среда должна содержать все вещества или их фрагменты, которые не могут быть синтезированы клетками, но необходимы им для роста, размножения и снабжения энергией. Полноценное, сбалансированное питание, удовлетворяя эти потребности организма, не обеспечивает накопления в среде таких первичных метаболитов, как органические кислоты.

Так как химический состав пищи должен соответствовать химическому составу организма, то приблизительное представление о потребности в тех или иных веществах может дать анализ состава мицелия. Молодой мицелий поверхностной культуры содержит больше воды (74—86 %), чем взрослый (65—67 %). Кроме того,

влажность мицелия понижается при увеличении осмотического давления питательной среды или культуральной жидкости, которое может происходить из-за повышения начальной концентрации сахара, концентрации лимонной кислоты (как вследствие ее образования грибом, так и испарения части воды при аэрации). На содержание влаги в мицелии оказывают влияние еще температура и относительная влажность продуваемого воздуха. Чем выше температура и сухость воздуха, тем меньше влажность мицелия.

Состав сухих веществ мицелия также изменяется с изменением его возраста. В начале ферментации мицелий (считая на безводный) содержит азота 5,5—5,9 %, в конце — 3,8—4,4 %, соответственно белкового азота 1,1—1,3 и 3,0—3,5 %. Содержание минеральных веществ (золы) в молодом мицелии около 10 %, во взрослом 3,5—6,0 %. Таким образом во взрослом мицелии на азотистые соединения (N×6,25) приходится 24—28 % и на минеральные вещества около 15 %. Остальное количество сухих веществ состоит в основном из углеводов (полисахаридов — хитина, целлюлозы, гемицеллюлоз и небольшого количества сахаров) — 38—46 %, органических кислот (кислот цикла трикарбоновых кислот и других), многоатомных спиртов (D-маннита, D-арабита, L-эритрита, инозита, глицерина) около 27 %, частично липидов — 2,5 %, в т. ч. 1,5 % лецитина, и стеролов 0,3—0,6 %.

Полисахариды входят в состав клеточных стенок гриба, представляющих собой волокнистые структуры, образованные сплетением микрофибрилл хитина и целлюлозы. Хитин значительно прочнее целлюлозы и является ее производным: одна из гидроксильных групп глюкозных остатков целлюлозы замещена ацетамидной группой ($-NHCOCH_3$). У A. niger такое замещение происходит и в галактане. Посредством гемицеллюлоз (гомо- и гетерополисахаридов) и белков основные структурные элементы клеточных стенок связываются в макромолекулярные комплексы. Для A. niger характерно присутствие нигерана (грибного декстрана) — $\alpha=1,3$- и $\alpha=1,4$-глюкана. На полисахариды в клеточной стенке приходится 80—90 %, остальные 20—10 % состоят главным образом из белков и липидов.

Из азота синтезируются белок, свободные аминокислоты. Он входит в состав пуриновых и пиримидиновых оснований, нуклеиновых кислот, ферментов, витаминов и хитина. Аминокислотный состав белка A. niger —продуцента лимонной кислоты [94] (%):

Состав аминокислот белка, %

Аланин	1,2	Лейцин	1,5—5,1
Аргинин	0,3—3,1	Лизин	1,2—5,4
Аспарагиновая кислота	2,5	Метионин	0,7—1,9
Валин	1,4—3,2	Пролин	0,85
Гистидин	0,17	Серин	1,1
Глютаминовая кислота	4,5	Треонин	1,0—2,9
Глицин	0,8	Триптофан	1,1
Изолейцин	0,9—1,3	Фенилаланин	3,2—3,8

Обязательной составной частью клеточных мембран и питательного резерва клетки являются липиды. Из минеральных веществ найдены (% к сухой массе мицелия): CaO 0,3—1,0; K_2O 0,8—1,1; P_2O_5 0,2—0,5; Zn 0,05—0,1; микроэлементы (мкг/г): Mg 140—510; Fe 21—44; Cu 7—20; Al 20—30; Co 1,0—1,5 [33].

Таким образом, подобно всем живым организмам, A. niger нуждается в обычных органогенах — углероде, азоте, кислороде, водороде и многих других элементах. В приведенных выше данных отсутствуют сведения о содержании серы, которая также безусловно необходима.

Содержатся витамины (мкг/г): тиамин 150; рибофлавин 70—85; пантотеновая кислота 244—727; никотинамид 120—840; фолиевая кислота 210; цианкобаламин 178 [103].

Существует мнение, что присутствие витаминов в среде не обязательно, так как A. niger может синтезировать их сам. Это подтверждается, в частности, ростом витаминозависимых грибов, например мукорового гриба Phycomyces blankesleeanus на фильтрате после культивирования A. niger на синтетической среде. Все же присутствие некоторых из них в питательной среде желательно. Так, биотин необходим для нормального функционирования всех организмов. Он является простетической группой карбоксилаз.

Добавление небольших количеств биотина в питательную среду стимулирует рост A. niger. Аналогичное действие оказывает добавление пантотеновой кислоты (простетической группы ацетил-КоА). Образование лимонной кислоты стимулируется тиамином.

Источники водорода и кислорода

Источниками водорода и кислорода, необходимыми для синтеза клеточных веществ, микроорганизмы всегда обеспечены за счет воды, в отсутствие которой вообще невозможны процессы питания. Кроме того, водород и кислород усваиваются из пищи. Молекулярный кислород необходим только для биоэнергетических потребностей аэробных организмов.

Источники углерода

Углерод используется для синтеза клеточных веществ, дыхания и образования органических кислот. Источником углерода обычно служат сахара. Усвоение того или иного сахара определяется конфигурацией его молекулы и способностью гриба вырабатывать соответствующие адаптивные ферменты. A. niger одинаково хорошо усваивает D-глюкозу, D-фруктозу, D-маннозу, L-сорбозу и сахарозу, плохо — D-галактозу и лактозу. По другим данным, гриб способен ассимилировать D-ксилозу, L-арабинозу, L-рамнозу (но не усваивает L-ксилозу и D-арабинозу), на $^1/_3$ раффинозу и полностью кестозу.

С точки зрения образования лимонной кислоты различные сахара неравноценны. Установлено [62], что штамм 6/5 накапливает в среде следующие количества лимонной кислоты (в относительных процентах) на среде Ролена с углеводами: сахарозой 100, инвертированным сахаром 89, глюкозой 89, мальтозой и галактозой 12, лактозой 2. Концентрация сахара не влияет на скорость ферментации. Согласно уравнению Михаэлиса—Ментен, концентрация сахара влияет на скорость ферментативной реакции до тех пор, пока весь фермент не насыщен средой (субстратом). Вследствие того что ферментов в клетке мало, они насыщаются при малой концентрации сахара. Следовательно, закон действия масс неприменим для регулирования биологических процессов. Однако исходная концентрация сахара влияет на степень его использования. С этой точки зрения по опытам глубинной ферментации оптимальной является концентрация 10—15 %, когда сахар ассимилируется на 98—96 %. При 20 % сахара ассимиляция составляет только 92 % (влияние реверсии сахара).

Источники азота

A. niger может ассимилировать азот из органических и минеральных соединений. Источники первого — аминокислоты, аспарагин и мочевина; бетаин не усваивается; источники второго — сульфат, хлорид и оксалат аммония, нитраты аммония, калия, натрия, кальция, газообразный аммиак. Если в мелассе мало азота, в питательную среду добавляют одну из указанных выше солей. Из смеси, содержащей оба источника азота, в первую очередь усваивается минеральный азот и, следовательно, органический азот не является необходимым.

Добавка некоторых аминокислот все же стимулирует рост гриба и образование лимонной кислоты. Аланин, аспарагиновая и глютаминовая кислоты и некоторые другие усваиваются грибом вместе с углеродным скелетом, ускоряя синтез клеточного белка. Прямое дезаминирование аминокислот приводит к образованию пировиноградной, α-кетоглутаровой, янтарной, фумаровой и щавелевоуксусной кислот, являющихся промежуточными продуктами метаболизма.

Минеральные источники азота неодинаково влияют на pH среды. Сульфаты и хлориды аммония, из которых катион поглощается быстрее аниона, сдвигают реакцию среды в кислую сторону (физиологически кислые соли); нитраты натрия, калия и кальция, наоборот, вследствие доминирующего поглощения аниона подщелачивают среду (физиологически щелочные соли).

Исследования, проведенные на синтетических сахарных средах, показали, что лучшим источником азота является нитрат аммония. Гриб усваивает азот с одинаковой скоростью из обеих частей соли, поэтому реакция среды не изменяется. Физиологически щелочные соли угнетают кислотообразование, физиологически кислые вызывают патологические изменения в морфологии, гифы становятся

уродливыми с пузыревидными отростками, пленки мицелия рассыпаются. Кроме того, в обоих случаях в процессе ферментации образуется больше побочных кислот [70].

При ферментировании мелассных сред добавляют лишь небольшое количество минерального азота, обычно хлорида аммония. Нитрат аммония нежелателен, так как некоторые виды бактерий, инфицирующих мелассные среды, восстанавливают нитраты в нитриты — сильные яды для гриба.

При дефиците азота в среде задерживается рост мицелия и формирование ферментной системы; при его избытке — накапливается много биомассы и снижается выход лимонной кислоты. Содержание азота в среде должно находиться в пределах 0,1—0,2 % [24]. Влияние содержания азота в среде в период кислотообразования A. niger недостаточно ясно. Еще С. П. Костычевым было высказано мнение, что образование лимонной кислоты A. niger начинается тогда, когда вследствие полного истощения азота рост гриба тормозится. Такое влияние дефицита азота подтверждено на синтетических средах с сахарозой [36], при ферментации Cand. lipolytica н-алканов [40] и глюкозы, когда единственным источником азота является аммонийный.

На этом основании утверждается, что этот дефицит является единственным фактором, вызывающим накопление в среде лимонных кислот.

В процессе ферментирования мелассных сред наблюдаются иные закономерности. Так, если в исходной питательной среде в среднем содержалось азота (мг/л) общего 500, аминного 27, то в культуральной жидкости в конце ферментации соответственно 430 и 30 [12]. Следовательно, содержание общего азота в среде уменьшилось лишь на 14 %.

Из данных, приведенных в табл. 17, видно, что больше других аминокислот расходуется глютаминовая, примерно в 2,5 раза меньше аспарагиновая кислота и аланин и еще меньше — лейцин и изолейцин.

По завершении накопления лимонной кислоты в культуральной жидкости остается еще довольно много этих аминокислот и серина, а содержание треонина и лизина возрастает приблизительно в два-три раза. Различный характер изменений в содержании отдельных аминокислот в течение ферментации объясняется сложностью обмена азота A. niger, сопровождающегося переаминированием и прямой ассимиляцией аминокислот, поглощением или экскрецией тех или иных аминокислот. Определенное значение может иметь и частичный автолиз.

Таким образом, при ферментировании мелассных сред нет дефицита в органическом усвояемом азоте и, как свидетельствуют кривые на рис. 10 (см. с. 81), начиная со вторых суток, на протяжении всего процесса наряду с образованием лимонной кислоты не перестает расти и мицелий. По мере роста мицелия в нем снижается содержание общего азота: в молодом двухсуточном мицелии

Таблица 17

Изменение в процессе поверхностной ферментации содержания аминокислот в питательной среде, мг/л

Аминокислоты	Сутки ферментации									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Глютаминовая	16382	13795	12501	11150	10814	7870	7130	6997	6739	6539
Аланин	495	465	325	237	130	114	129	138	137	130
Аспарагиновая	821	782	554	290	242	264	283	314	326	334
Лизин	54	59	65	85	85	104	123	138	142	145
Лейцин	339	337	223	131	97	53	58	60	67	75
Глицин	295	286	215	174	153	185	219	224	236	252
Серин	250	205	152	120	112	142	172	186	215	198
Треонин	85	82	70	65	61	77	116	126	131	145
Изолейцин	362	353	278	205	138	135	104	77	85	90

5,5—5,9 % азота, в том числе 1,1—1,3 % белкового, в девятисуточном соответственно 3,8—4,4 и 3,0—3,5 % [33].

Таким образом роль азота в процессе ферментационного культивирования A. niger на мелассных средах нуждается в более глубоком изучении. Известно, например, что у C. lipolytica добавление в среду аминокислот тормозило синтез лимонной кислоты, причем L-аланин, L-фенилаланин, L-лизин и D,L-аланин полностью ингибировали ее образование. На стадии ферментации при отсутствии в среде азота увеличение числа дрожжевых клеток происходило благодаря перераспределению азота между старыми и молодыми клетками, вследствие чего уменьшалось содержание азота в общей массе дрожжей.

Источники минеральных веществ

Эти вещества необходимы для синтеза и активации ферментов, регулирования концентрации водородных ионов и окислительно-восстановительных условий.

Фосфор, как и азот, — один из основных элементов питания. Он входит в состав нуклеиновых кислот, фосфопротеидов, фосфолипидов и ряда коферментов, участвует в синтезе макроэргических производных АДФ и АТФ, в фосфорилировании многочисленных органических соединений. Источником фосфора могут быть ортофосфорная кислота, ее соли и фосфорсодержащие органические соединения. В производстве лимонной кислоты в питательные среды обычно вносят гидрофосфат калия, который является и источником калия. При недостатке фосфора в среде нарушается усвоение грибом азота и замедляется синтез витаминов (тиамина, рибофлавина и никотиновой кислоты). Избыток фосфора вызывает усиление газообмена и снижение активности кислотообразования. Содержание фосфора в среде должно быть около

$0,025\ \%\ P_2O_5$ при поверхностном культивировании и 0,008 % — при глубинном [24].

Сера входит в состав некоторых аминокислот, белков, витаминов, коферментов (например, КоА). Она усваивается грибом из минеральных (сульфаты магния, цинка, железа) и органических (цистин, метионин и др.) соединений. Содержание серы в среде должно быть около 0,007 %; избыток серы, особенно при избытке фосфора и азота, ослабляет синтез лимонной кислоты, небольшой дефицит несколько усиливает ее синтез.

Калий необходим всем живым организмам; он участвует в фосфорилировании сахаров (при образовании гексозодифосфатов), гидролизе АТФ, а также в процессах декарбоксилирования. При недостатке калия тормозится синтез белков и рост мицелия. Небольшой избыток калия не сказывается отрицательно на образовании лимонной кислоты, но штаммы, содержащие много его в мицелии, образуют больше щавелевой кислоты. Сообщается, что образование щавелевой кислоты тормозится, если отношение содержания щелочных металлов (калия и натрия) к фосфатам будет меньше 0,83 (предпочтительно 0,60) и pH среды будет не выше 2,0. Соотношение в среде натрия и калия оказывает влияние на дыхание и рост A. niger: дыхание интенсивнее на средах с Na : K = 19 : 1; соотношение 4 : 1 благоприятнее для роста гриба. Нормальное содержание калия в среде 0,015 % при поверхностной и 0,008 % при глубинной ферментации [24].

Кальций при содержании в среде около $4 \cdot 10^{-4}\ \%$ необходим для роста мицелия. Предполагают, что он влияет на избирательную адсорбцию клеток и нейтрализует ядовитую для гриба щавелевую кислоту (в клетках гриба иногда откладываются кристаллы оксалата). При содержании в среде до 0,4 % кальций обычно не оказывает какого-либо влияния на A. niger, но некоторые глубинные штаммы, например Л-1, снижают выход лимонной кислоты.

Кроме перечисленных выше элементов, требуются и другие в микроколичествах (10^{-3}—$10^{-5}\ \%$). Роль микроэлементов в жизнедеятельности A. niger исключительно велика. Они входят в состав многих ферментов и являются активаторами примерно $^1/_3$ всех ферментов, содержащихся в клетках.

Для микроэлементов характерно образование хелатов с органическими соединениями; при этом активность микроэлемента возрастает в сотни и тысячи раз. Хелаты играют важную роль в реакциях субстрат — фермент. Возможно, что микроэлементы в форме внутрикомплексных соединений инициируют цепной процесс, осуществляемый через свободные радикалы, из которых только первый радикал возникает под воздействием микроэлементов, а в дальнейших стадиях радикальных реакций микроэлементы участия не принимают.

Избыток микроэлементов вреден. Токсическое действие заключается, в частности, в блокировании SH-групп молекул белка микроорганизмов. Имеющиеся в литературе данные о влиянии отдельных микроэлементов на рост и образование лимонной кислоты недостаточны и нередко противоречивы.

Еще в 1870 г. У. Ролен доказал безусловную необходимость цинка для роста A. niger. Позднее Р. А. Стайнберг подтвердил это безукоризненно поставленными опытами. Цинк — интегральная

часть многих ферментов и неспецифический активатор ряда ферментов, участвующих в метаболизме сахаров и белков. В настоящее время выделено 39 цинксодержащих ферментов, из них 7 — из микроскопических грибов. К типичным цинксодержащим ферментам относятся, например, альдолаза и 5-нуклеотидаза. Цинк снимает инактивацию фосфатаз цианидом, активирует процессы дыхания и рост мицелия, избыток цинка ведет к токсикозам и инактивации каталазы, пероксидазы и полифенолоксидазы.

При поверхностном культивировании гриба на сахарных средах с недостатком цинка (и марганца) пленка гриба становится гладкой, слизистой и погружается в раствор. Добавление цинка приводит к увеличению плавучести пленки, ее утолщению и появлению характерной морщинистости. Мицелий, выросший в среде с цинком, продуцирует больше лимонной кислоты, чем в среде, лишенной его. В присутствии цинка подавляется активность глюкозооксидазы, вследствие чего образуется меньше глюконовой кислоты. Содержание цинка в среде обычно поддерживают на уровне $1{,}5 \cdot 10^{-4}$ % (в расчете на $ZnSO_4$).

Железо входит в состав каталазы, пероксидазы, цитохрома, цитохромоксидазы, цитохромпероксидазы, флавопротеидов, активирует ряд других ферментов. На средах, бедных железом, образование тиамина, рибофлавина, никотиновой кислоты и пиридоксина усиливается, а биотина, инозита и *п*-аминобензойной кислоты — ослабляется. В отсутствие железа A. niger не образует конидий, в присутствии — лучше усваиваются ионы аммония из его нитрата. Железо стимулирует рост мицелия, особенно в присутствии цинка. Эффективное действие наблюдается только тогда, когда на 1 часть содержащегося в среде железа приходится 10 частей цинка.

При высоком содержании железа в среде ($10 \cdot 10^{-6}$ %) тормозится биосинтез лимонной кислоты и возрастает интенсивность образования щавелевой кислоты, активируются аконитатгидратаза и изоцитратдегидрогеназа (Д. Кларк). Избыток железа может быть снят добавлением ингибиторов (медь, крезол и др.). Концентрация железа, достаточная для роста гриба и образования лимонной кислоты, находится около $2 \cdot 10^{-6}$ %. В зависимости от штамма A. niger она может изменяться в широких пределах.

Установлена потребность A. niger в молибдене и меди. Специфичность молибдена доказана невозможностью его замены другими элементами без нарушения функции ферментов. Он является коферментом нитратной редуктазы, восстанавливающей нитраты до аммиака, который используется грибом для синтеза аминокислот и белков. Нитратная редуктаза, инактивированная цианидом, в присутствии молибдена вновь приобретает активность. Оптимальное содержание молибдена в среде — около $1{,}5 \cdot 10^{-5}$ %.

Медь входит в состав оксидоредуктаз и активирует ряд других ферментов. Она является энергичным комплексообразователем и реагирует со многими функциональными группами (карбоксиль-

ной, оксимной, энольной, сульфоновой), замещая водородный ион, а также с группами, в которых используются побочные валентности (амины, спиртовый гидроксил, карбонильная, тиоэфирная и др.). Медь образует комплексы со многими аминокислотами, пептидами и белками. Она является антагонистом железа и при замещении его изменяет ферментную систему гриба.

Для роста гриба достаточно содержания в среде $5 \cdot 10^{-5}$ % ионов меди при появлении положительного действия лишь на фоне других микроэлементов. При концентрации 10^{-4} % и более тормозятся развитие гриба и кислотообразование. Согласно патенту М. А. Батти, вредное действие избытка меди на кислотообразование может быть снято кратковременным повышением pH среды до 3,5—4,0 при добавлении гидроксида аммония (происходит реактивация). Следует иметь в виду, что медь является составной частью многих фунгицидных препаратов, применяемых при выращивании сахарной свеклы, и может повышать ее содержание в мелассе.

Марганец участвует во многих реакциях метаболизма. Он входит в состав изоцитратдегидрогеназы и оксалоацетазы, активирует маликодегидрогеназу, декарбоксилазу щавелевоянтарной кислоты, участвует в превращениях изолимонной кислоты в щавелевоянтарную, α-кетоглутаровой кислоты в янтарную, в реакциях фосфорилирования, синтеза аминокислот, белков, витаминов и других. Благодаря окислительным свойствам он играет большую роль в поддержании в клетках окислительно-восстановительных условий.

В отсутствие марганца становится аномальной морфология гриба, повышается содержание хитина, снижается содержание β-глюкана и галактозных полимеров в клеточной стенке. В присутствии марганца стимулируется образование гидролитических ферментов и цитратсинтетазы при одновременном снижении образования ферментов, трансформирующих молекулу лимонной кислоты в цикле трикарбоновых кислот. Как при недостатке, так и при избытке марганца снижается выход лимонной кислоты. Добавление других катионов не снижает отрицательного действия избытка марганца [92, 104, 105].

Магний принимает активное участие во многих ферментативных реакциях обмена углеводов. Считается, что между содержанием магния и фосфора в среде должно существовать соотношение 1 : 36. Такая тесная связь между этими элементами объясняется тем, что магний, как и цинк, восстанавливает активность фосфатаз, инактивированных цианидом и другими ядами. По некоторым данным, положительное влияние цинка на рост гриба проявляется только в присутствии магния и кадмия. Магний, как и марганец, необходим для синтеза нуклеиновых кислот. От их присутствия зависит активность ДНК- и РНК-полимеразы.

Доказана потребность A. niger и в других микроэлементах — кобальте, галлии, ванадии. Кобальт входит в состав цианокобаламина; при отсутствии кобальта клетка погибает. Галлий в концентрации $2 \cdot 10^{-5}$ % способствует росту и конидиеношению.

Имеются наблюдения, показывающие, что при ферментации катионированных мелассных сред A. niger в аппаратах из легированной стали выход лимонной кислоты увеличивается по сравнению с аппаратами из стекла. Это объясняется переходом в раствор некоторых микроэлементов. Таким образом, вопрос о выборе конструкционного материала для изготовления ферментаторов не может быть решен однозначно, исходя только из коррозионной стойкости.

ДЫХАНИЕ И АЭРАЦИЯ

Дыхание — сложный процесс окисления органических веществ, снабжающий клетку химической энергией и материалом для синтеза органических веществ.

При полном окислении моносахаридов (глюкозы) согласно суммарному уравнению химической реакции

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + 2822 \text{ кДж/моль}$$

поглощается кислород, выделяются диоксид углерода, вода и энергия свободного окисления (тепло). Изменение свободной энергии ΔF равно — 2872 кДж ($\Delta F = \Delta H - T\Delta S$, где ΔH — тепловой эффект реакции, равный 2822 кДж, T — абсолютная температура, ΔS — изменение энтропии). При неполном окислении выделяется меньше тепла, так как часть энергии, заключенной в молекуле глюкозы, остается в продукте реакции.

Для клетки необходимо, чтобы содержащаяся в химическом соединении энергия извлекалась малыми порциями, которые легко могут быть использованы для образования АТФ. При полном окислении глюкоза сначала по реакциям гликолиза превращается в пировиноградную кислоту, которая затем окисляется в цикле трикарбоновых кислот и в цитохромной системе до диоксида углерода и воды. В этих реакциях принимают участие многие ферменты, АДФ и АТФ, аккумулирующие в себе химическую энергию.

С энергетической точки зрения обмен углеводов, идущий по дыхательному пути, более выгоден, чем гликолиз: при распаде 1 моля глюкозы в первом случае образуется 36 молекул АТФ, во втором — только 2. Энергия свободного окисления составляет соответственно 2822 и 198 кДж. Если принять энергию одной макроэргической связи в среднем за 30 кДж, то при полном окислении в АТФ запасается 1140 кДж, при гликолизе — 60 кДж, что составляет около 40 и 30 % к высвобождающейся энергии. Следовательно, при полном окислении сахара больше не только общий уровень аккумулируемой химической энергии, но и удельное количество ее.

Эта энергия тратится клеткой на реакции синтеза органических соединений, обратный перенос электронов в дыхательной цепи, перенос веществ против градиента концентрации, механические перемещения, создание электрокинетического потенциала и т. д.

При отсутствии углеводов на дыхание могут расходоваться жиры, белки, органические кислоты. В соответствии с этим изменяется и величина дыхательного коэффициента — отношения объема выделенного диоксида углерода к объему поглощенного кислорода. Как следует из приведенного выше уравнения, при полном окислении глюкозы дыхательный коэффициент равен 1,0. Для других субстратов он будет иным (для жира и белков 0,7—0,8, лимонной кислоты 1,3, щавелевой кислоты 4,0), что объясняется различной степенью их окисленности.

Исследовались газообмен и интенсивность дыхания A. niger в процессе поверхностной ферментации мелассных сред [25, 26]. Как показывает табл. 18, коэффициент газообмена отражает интенсивность протекающих в клетках окислительных процессов (в том числе и дыхания), причем количество поглощаемого кислорода значительно превышает количество выделяемого диоксида углерода. Величина коэффициента газообмена меньше единицы, по мнению авторов, объясняется потреблением кислорода вследствие синтеза органических кислот, например лимонной кислоты, по уравнению $2C_6H_{12}O_6+3O_2 \rightarrow 2C_6H_8O_7+4H_2O$.

Таблица 18

Газообмен и кислотообразование A. niger

Показатели	Сутки			
	1—3	4—6	7—9	всего за 9
Получено кислот, г	16,60	35,09	19,97	71,66
Выделилось CO_2, мл	2010	3384	4134	9 528
Поглотилось O_2, мл	3415	8895	7590	19 900
Коэффициент газообмена (CO_2/O_2)	0,59	0,38	0,54	0,48

В табл. 19 показана величина дыхательного коэффициента A. niger, который в начале процесса больше единицы, согласно энергично идущему синтезу веществ плазмы клеток в основном

Таблица 19

Интенсивность дыхания и дыхательный коэффициент

Показатели	Сутки		
	1—3	4—6	7—9
Масса безводного мицелия, г	1,23	3,49	6,60
Интенсивность дыхания[1]:			
выделилось CO_2, мл	545	324	210
поглотилось O_2, мл	447	309	212
Дыхательный коэффициент	1,22	1,05	0,99

[1] В расчете на 1 г безводного гриба за 1 сут.

более восстановленных, чем исходный сахар, но затем снижается до единицы, отражая процесс нормального дыхания и старения мицелия.

Из этих опытов авторы сделали вывод, что все количество диоксида углерода, выделяющееся в процессе ферментации A. niger в аэробных условиях, является результатом нормального дыхания за счет сахара среды.

Газообмен усиливается при увеличении концентрации азота и фосфора в среде и ослабляется при снижении их концентрации и концентрации сахара. Интенсивность газообмена изменяется при отклонении температуры от оптимальной для жизнедеятельности гриба и других условий, рассмотренных ниже.

A. niger — облигатный (строгий) аэроб и не может существовать без кислорода, который ему необходим как акцептор водорода, отщепляемого от окисляемых веществ. Поскольку дыхательные ферменты содержатся внутри цитоплазмы (в митохондриях), микроорганизмы могут использовать только растворенный в ней кислород. Источником кислорода является атмосферный воздух. При поверхностном культивировании продуваемый воздух омывает кюветы с питательной средой и мицелием гриба, снабжая его кислородом и удаляя выделяющиеся диоксид углерода и тепло; при глубинном культивировании воздух насыщает питательную среду, удаляет из нее диоксид углерода и часть тепла, а в эрлифтных ферментаторах еще и перемешивает среду.

Для нормального протекания ферментации необходима непрерывная обильная аэрация. Так как растворимость кислорода в воде очень мала, то даже кратковременные перерывы при глубинной ферментации недопустимы. Понижение или повышение концентрации кислорода в воздухе по сравнению с обычной тормозит рост мицелия. Аэрация культуральной жидкости со сформировавшимся мицелием воздухом, обогащенным кислородом, повышает выход лимонной кислоты, например, при добавлении 8 % кислорода — на 30 % [25].

Относительная влажность воздуха при поверхностном культивировании должна находиться в пределах 60—70 %, при этом происходит умеренное испарение влаги и охлаждение мицелия. При 100%-ной относительной влажности воздуха влага из мицелия не испаряется и возможен его перегрев. При влажности менее 60 % испаряется много воды, клетки мицелия восполняют ее за счет культуральной жидкости, которая концентрируется, ухудшая условия кислотообразования. При глубинном культивировании влажность воздуха не играет такой большой роли; воздух, проходя через высокий слой жидкости в ферментаторе, почти полностью насыщается влагой.

ТЕМПЕРАТУРА

Температура воздуха при поверхностном культивировании регулируется в зависимости от стадии процесса (прорастание конидий и формирование мицелия, активное кисло-

тообразование, окончание процесса).

По отношению к температуре A. niger является мезофилом. Оптимальная температура для его роста лежит в пределах 33—37 °С (минимальная 7—10 °С, максимальная 40—43 °С), для образования лимонной кислоты — 31—32 °С [36].

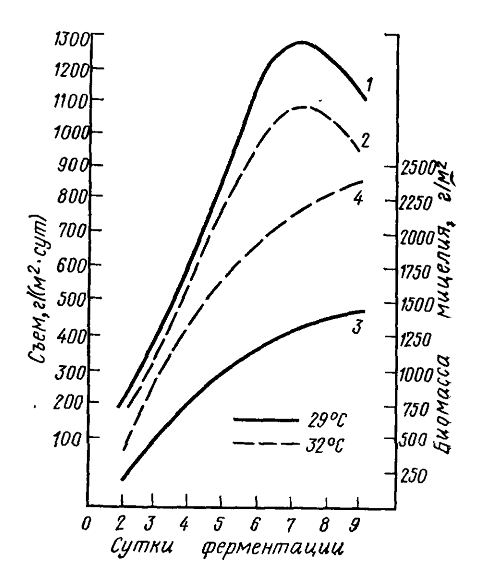


Рис. 10. Съем лимонной кислоты (*1*, *2*) и количество биомассы (*3*, *4*) в зависимости от температуры воздуха в камере.

При выращивании мицелия с целью ускорения прорастания конидий и развития грибницы температуру поддерживают на уровне 35—37 °С. Во время кислотообразования температуру снижают до оптимальной (31—32°С). Как видно из рис. 10, повышение температуры в камере при поверхностном способе ферментации усиливает накопление биомассы, но отрицательно отражается на съеме лимонной кислоты в граммах с 1 $м^2$ в сутки (и соответственно выходе от сахара). В глубинном способе при 35 °С выход лимонной кислоты уменьшается на 15 %, при 25 °С увеличивается на 20 % при одновременном увеличении продолжительности ферментации.

АКТИВНАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ ВОДОРОДНЫХ ИОНОВ И ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ СРЕДЫ

Цитоплазма клеток малопроницаема для ионов H^+ и OH^-, кроме того, она обладает значительной буферностью, поэтому смещение внутриклеточного pH под влиянием pH наружной среды бывает сравнительно медленным и слабым. Величина pH внутри клетки A. niger может изменяться в пределах 4,2—5,5 без вреда для клетки. Слой цитоплазмы, примыкающий к стенке клетки, более подвержен действию ионов и испытывает обратимые и необратимые изменения, отражающиеся в той или иной мере на жизнедеятельности организма. Кроме прямого действия pH оказывает и косвенное, изменяя степень диссоциации компонентов питательной среды.

Грибы вида A. niger могут развиваться в широком интервале pH — от 1,5 до 11, но лучше всего при pH 3—7. Большое значение имеет состав среды, особенно источник азота. На синтетической сахарной среде при использовании нитрата аммония оптимум pH

лежит около 3, при использовании хлорида аммония — около 4. На мелассной среде конидии лучше прорастают при pH 6,8—7,2. Начальная величина pH 4,5 сильно задерживает прорастание, а при pH 2,5 конидии даже не набухают, что ставится в связь с освобождением в среде ядовитых соединений (диоксида серы, азотсодержащих оснований и других). В среде с pH>7,5 конидии сильно разбухают и лопаются [24].

В щелочной среде образовывалась преимущественно щавелевая кислота, при pH 5,0 — глюконовая. Следовательно, после сформирования мицелия очень важно возможно быстрее снизить pH до 3,5—3,0. Сильные кислотообразователи, какими являются штаммы, применяемые в производстве лимонной кислоты, накапливают в культуральной жидкости 15 % и больше лимонной кислоты, сдвигая pH, например, до 1,6. Наблюдаемое при этом угнетение кислотообразования связано главным образом не с величиной pH, а с действием лимонной кислоты как метаболита. Из сказанного выше следует, что в процессе роста гриба и образования им лимонной кислоты необходимо поддерживать различную величину pH культуральной жидкости.

Аэрация проводится не только для удовлетворения непосредственной потребности в кислороде аэробных микроорганизмов, но и для создания в среде необходимых окислительно-восстановительных условий, которые характеризуются величиной окислительно-восстановительного потенциала — Eh (в вольтах). Эти условия выражают также через показатель rH_2, представляющий собой отрицательный логарифм давления молекулярного водорода в среде. Так как окислительно-восстановительные условия в значительной мере зависят от активной концентрации ионов водорода в среде, то связь между ними выражается уравнением:

$$rH_2 = Eh:0,03 + 2\,pH \text{ (при температуре 20°C)}.$$

В среде, сильные окислительные свойства которой соответствуют условиям, создаваемым насыщением ее кислородом (при избыточном давлении 98,01 кПа), $rH_2=41$; при сильно восстановительных условиях, соответствующих насыщению среды молекулярным водородом (при таком же избыточном давлении), $rH_2=0$. При равновесии окислительно-восстановительных процессов в среде $rH_2=28$. Значения rH_2 ниже этой величины указывают на бóльшую или меньшую восстановительную способность среды, а выше — на окислительную ее способность. Присутствие в среде свободного кислорода определяет преобладание окислительных процессов.

Величина rH_2 оказывает большое влияние на направление обмена веществ A. niger [38]. На синтетических сахарных средах в поверхностных условиях культивирования гриба при rH_2 15—17 образуется лимонная кислота, при rH_2 12—14 наряду с лимонной кислотой накапливается этиловый спирт. При rH_2 более 20 и около 2 лимонная кислота не продуцируется (в первом случае сахар полностью окисляется до диоксида углерода и воды). На

мелассных средах при поверхностном культивировании начальная величина rH_2 обычно около 19, в период формирования пленки гриба снижается до 17 и затем не изменяется до конца ферментации.

Как показали исследования, в течение первых суток rH_2 среды, засеянной подросшим мицелием и аэрируемой воздухом, находится на уровне 19,5, со вторых суток снижается, падая на третьи сутки до 17,2, а на четвертые — шестые сутки вновь повышается, достигая к концу ферментации исходной величины [25]. Такой характер изменения rH_2 хорошо согласуется с изменением величины коэффициента газообмена гриба.

Чрезмерная аэрация во время образования лимонной кислоты в глубинных условиях приводит к повышению rH_2, интенсификации дыхания и образования щавелевой кислоты. Недостаточная аэрация снижает rH_2, лимонная кислота накапливается медленнее, больше образуется глюконовой кислоты. Таким образом, интенсивность аэрации среды должна быть поставлена в зависимость от величины rH_2 для разных стадий процесса ферментации.

ОСМОТИЧЕСКОЕ ДАВЛЕНИЕ И АКТИВНОСТЬ ВОДЫ

Большое значение для клетки имеет активность воды, содержащейся в питательной среде, выражаемая уравнением:

$$\alpha_W = P_S/P_W,$$

где P_S — давление водяного пара раствора; P_W — давление пара чистой воды при той же температуре.

Очевидно, что α_W эквивалентна относительной влажности воздуха, находящегося в равновесии с раствором.

Между активностью воды и осмотическим давлением (осмоляльностью — m_0) существует связь, описываемая уравнением:

$$m_0 = -128 \lg \alpha_W.$$

Для роста A. niger оптимальная активность воды равна 0,975, минимальная — 0,86; осмоляльность (тоничность) соответственно 1,28 и 8,4. Протопласты клеток ведут себя подобно осмометрам: в зависимости от величины осмоляльности они набухают или сжимаются.

Клетки A. niger обладают сравнительно высоким осмотическим давлением и большой осмотолерантностью. В производственных мелассных средах осмотическое давление достигает 3000 кПа и больше. Конидии штаммов 82 и 90 не развиваются при осмотическом давлении, превышающем 10 000 кПа [24].

РОСТ И КИСЛОТООБРАЗОВАНИЕ

Полный цикл развития A. niger (от конидии к конидии) был описан на с. 46. Он имеет место при производстве посевного материала, в условиях же ферментации конидиеобра-

зования не наблюдается, гриб продолжает расти и образовывать лимонную кислоту, особенно при смене питательной среды.

На несменяемой питательной среде популяция мицелиальных грибов проходит несколько фаз. Однако в отличие от бактерий и дрожжей у мицелиальных грибов отсутствует экспоненциальная фаза и накопление биомассы по времени происходит более или менее прямолинейно. Такой характер роста, по-видимому, связан с лимитированием в снабжении кислородом: в условиях поверхностной культуры — с трудностью проникновения в толщу мицелия, в условиях глубинной культуры — вследствие сильного нарастания вязкости культуральной жидкости и частичного образования шаровидных колоний. В отечественном производстве лимонной кислоты глубинным способом ферментации мелассную среду засевают мицелием A. niger, предварительно подращенным на среде такого же состава и концентрации, находящимся в стадии активного роста и в относительно большом количестве.

Условия развития A. niger при поверхностном и глубинном культивировании различны. В первом случае мицелий покрывает жидкую среду пленкой, которая растет до тех пор, пока не будут исчерпаны питательные вещества. Поскольку площадь кювет ограничена бортами, пленка, разрастаясь, утолщается и с нижней стороны становится мелкоскладчатой.

Поступление субстрата и кислорода воздуха происходит через мицелиальные тяжи — параллельные соединения гиф. Тем же путем удаляются и продукты метаболизма — органические кислоты и диоксид углерода. При этом субстрат и диоксид углерода движутся от нижних к верхним клеткам, а кислород и органические кислоты, наоборот, от верхних к нижним. Естественно, что верхние (воздушные) и нижние (непосредственно обращенные к поверхности субстрата) клетки мицелия находятся в неодинаковых условиях питания и аэрации. Нижние клетки в отношении питания в лучших условиях, но для них затруднен доступ кислорода и отвод диоксида углерода; могут создаться даже анаэробные условия. Верхние клетки, наоборот, хуже обеспечены питанием, но лучше — кислородом; они дышат более интенсивно, образуют меньше лимонной кислоты и при сильной аэрации способны полностью окислять сахар до диоксида углерода и воды.

При глубинном культивировании A. niger формируются однородные клетки с одинаковой кислотообразующей активностью, синтезирующие значительно больше лимонной кислоты, чем та же масса их при поверхностном культивировании [24].

Относительное содержание лимонной кислоты в общем составе органических кислот культуральной жидкости в конце ферментации: до 99 % — при поверхностном способе, около 85 % — при глубинном, что объясняется не только особенностями применяемых штаммов. В первом случае даже на более концентрированных мелассных растворах, чем используемые при глубинной ферментации, A. niger быстрее преодолевает их буферность, образуя в субстрате под сформировавшейся пленкой грибницы тонкий кис-

лый слой, что обеспечивает продуцирование только лимонной кислоты.

Особенностью поверхностной ферментации является также то, что образующаяся в мицелии лимонная кислота диффундирует в культуральную жидкость при отсутствии механического перемешивания. При этом скорость диффузии лимонной кислоты в среде на несколько порядков ниже скорости ее образования грибом и, следовательно, основным фактором, лимитирующим скорость обмена веществ, является заторможенная диффузия кислоты (К. Вендель).

Глава 5. БИОСИНТЕЗ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

ОСНОВНОЙ ПУТЬ БИОСИНТЕЗА

Лимонная кислота образуется в цикле трикарбоновых кислот, которому предшествует гликолитический распад сахаров до пировиноградной кислоты.

Гликолиз

Этот путь распада углеводов называется еще гексозодифосфатным, или путем Эмбдена — Мейергофа — Парнаса (ЭМП). Вначале дисахариды ферментативно расщепляются до моносахаридов, например, сахароза β-фруктофуранозидазой расщепляется до глюкозы и фруктозы. Гликолиз начинается фосфорилированием моносахаридов с участием гексокиназы и АТФ, при этом из глюкозы образуется глюкозо-6-фосфат (см. схему на с. 86); буквой Ф в кружочке обозначен фосфатный остаток — PO_3H_2, $Ф_н$ — неорганический фосфат). Реакция в клетке необратима.

Глюкозо-6-фосфат затем изомеризуется в более лабильный фруктозо-6-фосфат. Реакция катализируется фосфоглюкоизомеразой и легко протекает в обоих направлениях. Фруктозо-6-фосфат подвергается второму фосфорилированию, в результате которого образуется фруктозо-1,6-дифосфат. Реакция катализируется фосфофруктокиназой при участии АТФ и так же, как и образование глюкозо-6-фосфата, необратима.

Молекула фруктозо-1,6-дифосфата под действием фермента альдолазы подвергается дисмутации — распаду на две триозы: 3-фосфоглицериновый альдегид и фосфодиоксиацетон; между ними устанавливается равновесие, которое смещается в сторону 3-фосфоглицеринового альдегида с помощью фермента триозофосфатизомеразы.

На рассмотренных стадиях гликолиз протекает с затратой энергии, основное же его назначение, особенно в анаэробных условиях, — это обеспечение организма энергией. Поэтому в последующих стадиях включаются окислительно-восстановительные реакции, которые не только регенерируют израсходованные две

Глюкоза $\xrightarrow[\text{АДФ}]{\text{АТФ}}$ Глюкозо-6-фосфат $\rightleftarrows$ Фруктозо-6-фосфат $\xrightarrow[\text{АДФ}]{\text{АТФ}}$ Фруктозо-1,6-дифосфат $\rightleftarrows$

Фосфодиоксиацетон ⇅ 3-фосфоглицериновый альдегид $\xrightarrow[\text{НАД}\cdot H_2]{Ф_н + \text{НАД}}$ 1,3-дифосфоглицерат $\xrightarrow[\text{АТФ}]{\text{АДФ}}$ 3-фосфоглицерат $\rightleftarrows$

2-фосфоглицерат $\overset{-H_2O}{\rightleftarrows}$ Фосфоенолпируват $\xrightarrow[\text{АТФ}]{\text{АДФ}}$ Пируват

Гликолитический путь катаболизма глюкозы

молекулы АТФ, но и образуют две новые (так как из одной молекулы гексозы образуются две молекулы 3-фосфоглицеринового альдегида).

3-фосфоглицериновый альдегид окисляется до 1,3-дифосфоглицериновой кислоты. Эта единственная в гликолизе окислительная реакция с участием НАД и $Ф_н$ катализируется глицеральдегидфосфатдегидрогеназой.

В следующей реакции одна из фосфатных групп 1,3-дифосфоглицериновой кислоты переносится на АДФ с образованием 3-фосфоглицериновой кислоты и АТФ. Реакция катализируется фосфо-

глицераткиназой. 3-Фосфоглицериновая кислота с помощью фосфоглицератмутазы превращается в 2-фосфоглицериновую кислоту, которая дегидратируется с образованием фосфоенолпировиноградной кислоты. Реакция катализируется енолазой (фосфопируватгидратазой). Завершается гликолиз переносом богатой энергией фосфатной группы с фосфоенолпировиноградной кислоты на АДФ с образованием АТФ и пировиноградной кислоты. Реакция необратима и катализируется пируваткиназой.

Наряду с гликолизом у A. niger частично реализуется и другой путь окисления углеводов — пентозофосфатный, называемый также пентозным, гексозомонофосфатным, или фосфоглюконатным. Общим с гликолизом исходным продуктом является глюкозо-6-фосфат, но в дальнейшем их пути расходятся: фермент фосфофруктокиназа определяет дихотомический путь, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа — апотомический. Конечными продуктами процесса являются 3-фосфоглицериновый альдегид и рибозо-5-фосфат. Первый из них по реакциям гликолиза превращается в пировиноградную кислоту, поэтому пентозофосфатный цикл рассматривается как шунт гликолитического пути. Основное назначение цикла — снабжение клетки НАД.H_2, необходимой для восстановительных реакций синтеза липидов и стероидов, и пентозами, в основном рибозой, используемой в синтезе нуклеотидов и нуклеиновых кислот.

Цикл трикарбоновых кислот

В этом цикле (ЦТК), называемом также циклом Кребса, в аэробных условиях происходит полное окисление пировиноградной кислоты.

Для запуска ЦТК необходимы ацетил-КоА и щавелевоуксусная кислота, образование которых предшествует ЦТК. При этом из двух молекул пировиноградной кислоты, получающихся при гликолизе молекулы глюкозы, одна подвергается окислительному декарбоксилированию и активированию образующейся уксусной кислоты при посредстве КоА. Окисление пировиноградной кислоты до ацетил-КоА катализируется пируватдегидрогеназной системой, представляющей собой мультиферментный комплекс, включающий три различных фермента и пять коферментов. Суммарное уравнение реакции:

$$CH_3COCOOH + \text{КоASH} + \text{НАД} \rightarrow CH_3CO \sim \text{SКоА} + \text{НАД}.H_2 + CO_2.$$

Ввиду того что реакция сопровождается значительным уменьшением свободной энергии, она практически необратима.

Другая молекула пировиноградной кислоты под действием АТФ-зависимой пируваткарбоксилазы конденсируется с выделившейся молекулой диоксида углерода в щавелевоуксусную кислоту:

$$CH_3COCOOH + CO_2 + \text{АТФ} \rightleftharpoons COOH.CH_2.CO.COOH + \text{АДФ} + \text{Ф}_н.$$

Ацетил-КоА, реагируя с щавелевоуксусной кислотой в енольной форме, переносит на нее ацетильный остаток, в результате чего синтезируется лимонная кислота и регенерируется КоА SH:

$$\begin{array}{l} CH{-}COOH \\ \| \\ C(OH){-}COOH \end{array} + CH_3CO{\sim}SKoA + H_2O \rightarrow \begin{array}{l} CH_2{-}COOH \\ | \\ C(OH){-}COOH \\ | \\ CH_2{-}COOH \end{array} + KoASH.$$

Реакция катализируется цитратсинтетазой и так как происходит со значительным уменьшением свободной энергии, то практически смещена вправо.

Затем лимонная кислота под действием аконитатгидратазы превращается в цис-аконитовую кислоту, а она в свою очередь — в изолимонную:

$$\begin{array}{l} CH_2{-}COOH \\ | \\ C(OH){-}COOH \\ | \\ CH_2{-}COOH \end{array} \underset{\longleftarrow}{\xrightarrow{-H_2O}} \begin{array}{l} CH_2{-}COOH \\ | \\ C{-}COOH \\ \| \\ CH{-}COOH \end{array} \underset{\longleftarrow}{\xrightarrow{+H_2O}} \begin{array}{l} CH_2{-}COOH \\ | \\ CH{-}COOH \\ | \\ CH(OH){-}COOH. \end{array}$$

Изолимонная кислота превращается в α-кетоглутаровую кислоту по реакции, катализируемой НАД — зависимой изоцитратдегидрогеназой. Реакция протекает в две стадии, сначала происходит дегидрирование и образование щавелевоянтарной кислоты. а затем в результате декарбоксилирования — α-кетоглутаровой кислоты:

$$\begin{array}{l} CH_2{-}COOH \\ | \\ CH{-}COOH \\ | \\ CH(OH){-}COOH \end{array} \underset{\longleftarrow}{\xrightarrow{-H_2}} \begin{array}{l} CH_2{-}COOH \\ | \\ CH{-}COOH \\ | \\ CO{-}COOH \end{array} \underset{\longleftarrow}{\xrightarrow{-CO_2}} \begin{array}{l} CH_2{-}COOH \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CO{-}COOH. \end{array}$$

α-Кетоглутаровая кислота претерпевает окисление до янтарной кислоты (сукцината). Эта реакция, как и окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты, идет в несколько стадий. Первая, необратимая стадия катализируется α-кетоглутаратдегидрогеназой — сложной системой ферментов. При этом одновременно отщепляются молекулы водорода и диоксида углерода и образуется сукцинил-КоА:

$$\begin{array}{l} CH_2{-}COOH \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CO{-}COOH \end{array} + KoASH + НАД \rightarrow \begin{array}{l} CH_2{-}COOH \\ | \\ CH_2CO{\sim}SKoA \end{array} + НАД.H_2 + CO_2.$$

Вторая стадия катализируется сукцинил-КоА-синтетазой; сукцинил-КоАS реагирует с неорганическим фосфатом и АДФ, распадаясь на янтарную кислоту, АТФ и КоАSH:

$$\begin{array}{l} CH_2{-}COOH \\ | \\ CH_2CO{\sim}SKoA \end{array} + Ф_н + АДФ \rightleftarrows \begin{array}{l} CH_2{-}COOH \\ | \\ CH_2{-}COOH \end{array} + АТФ + KoASH.$$

Янтарная кислота окисляется в фумаровую. Реакция катализируется ФАД-зависимой сукцинатдегидрогеназой:

$$\begin{array}{l} CH_2\text{—}COOH \\ | \\ CH_2\text{—}COOH \end{array} + \text{ФАД} \rightleftarrows \begin{array}{l} CH\text{—}COOH \\ \| \\ CH\text{—}COOH \end{array} + \text{ФАД}.H_2.$$

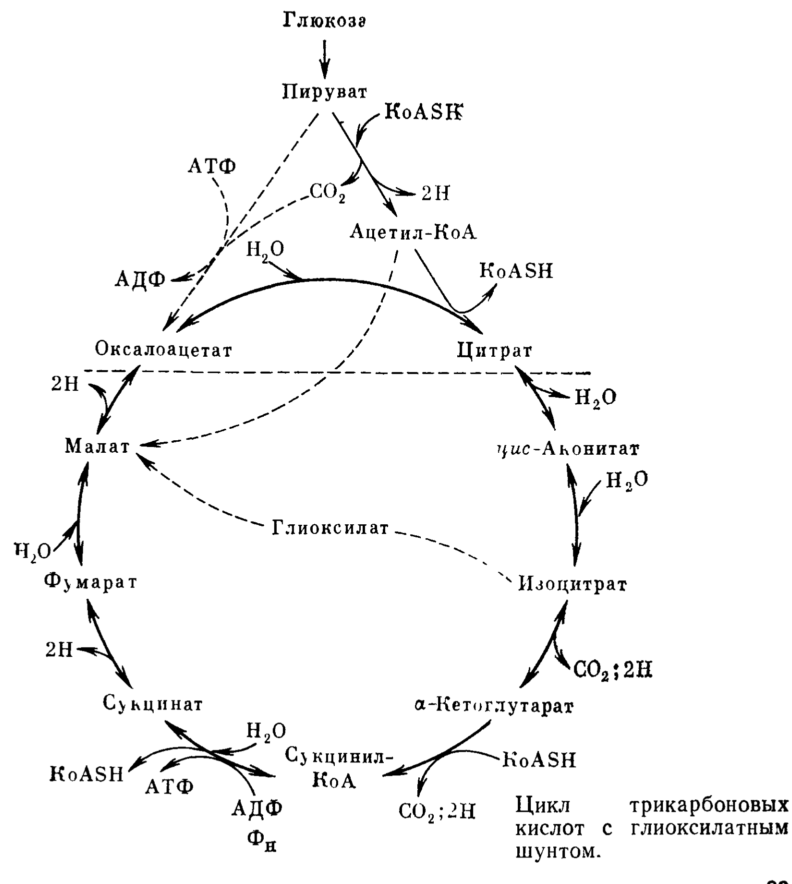
Фумаровая кислота, присоединяя воду под действием фермента фумаратгидратазы, превращается в яблочную кислоту (малат):

$$\begin{array}{l} CH\text{—}COOH \\ \| \\ CH\text{—}COOH \end{array} + H_2O \rightleftarrows \begin{array}{l} CH_2\text{—}COOH \\ | \\ CH(OH)\text{—}COOH. \end{array}$$

Последней реакцией ЦТК является окисление яблочной кислоты до щавелевоуксусной (оксалоацетата):

$$\begin{array}{l} CH_2\text{—}COOH \\ | \\ CHOH\text{—}COOH \end{array} + \text{НАД} \rightleftarrows \begin{array}{l} CH_2\text{—}COOH \\ | \\ CO\text{—}COOH \end{array} + \text{НАД}.H_2.$$

Реакция катализируется НАД-зависимой малатдегидрогеназой. Общая схема цикла приведена ниже.



Цикл трикарбоновых кислот с глиоксилатным шунтом.

При ферментации н-алканов циклу трикарбоновых кислот предшествует их окисление до ацетил-КоА по следующим реакциям:

$$CH_3(CH_2)_nCH_3 \rightarrow CH_3(CH_2)_nCH_2OH \rightarrow CH_3(CH_2)_nCHO \rightarrow CH_3(CH_2)_nCOOH \rightarrow$$
$$\rightarrow CH_3(CH_2)_{n-2}CO \sim SKoA \rightarrow CH_3(CH_2)_{n-4}CO \sim SKoA \rightarrow \text{Ацетил-КоА.}$$

Окисление н-алкана начинается с терминального (концевого) атома углерода, обычно с одного конца (монотерминальное окисление) с последовательным образованием первичного спирта, альдегида, монокарбоновой кислоты. Затем монокарбоновая кислота подвергается β-окислению, приводящему к укорочению цепочки на два углеродных атома и образованию ацил-КоА. После ряда β-окислений образуется ацетил-КоА, вовлекаемый в реакции ЦТК

В отличие от гликолиза при аэробном окислении пировиноградной кислоты ряд реакций, следующих одна за другой, замыкается. При каждом обороте в цикл вовлекается одна молекула уксусной кислоты и одна молекула щавелевоуксусной, но первая кислота полностью окисляется, вторая же в конце цикла регенерируется и может участвовать в окислении неограниченно большого числа молекул уксусной кислоты. В результате реакций в ЦТК образуются две молекулы диоксида углерода и четыре пары атомов водорода. Последние (или соответствующие им электроны) в цитохромной системе переносятся к конечному их акцептору — молекулярному кислороду. Перенос сопровождается большим уменьшением свободной энергии, значительная часть которой аккумулируется в форме АТФ. Таким образом, сам цикл не нуждается в кислороде, но зависит от него, так как тесно связан с дыхательной цепью.

Кроме углеводов в ЦТК могут «сгорать» продукты деградации липидов и белков. При β-окислении жирных кислот образуется ацетил-КоА, при прямом дезаминировании аминокислот — органические кислоты, непосредственно участвующие в данном цикле. Наряду с этим ацетил-КоА является предшественником жирных кислот, пировиноградная кислота — предшественником аланина, серина и цистеина, α-кетоглутаровая — глютаминовой кислоты, фумаровая и щавелевоуксусная — аспарагиновой кислоты.

АНАПЛЕРОТИЧЕСКИЕ ПУТИ

Выведение любой из кислот — α-кетоглутаровой, янтарной, фумаровой или щавелевоуксусной — для целей синтеза белков прекратит функционирование цикла. Восполнение утечки этих промежуточных продуктов принимают на себя анаплеротические реакции и важнейшая из них — карбоксилирование пировиноградной кислоты с образованием щавелевоуксусной кислоты — акцептора ацетил-КоА (см. на схеме реакции выше пунктирной линии). На основании анализа массы и энергии при лимоннокислотной ферментации и построения математической модели процесса сделан вывод о данном пути как наиболее вероятном [115]. Кроме того, у гетеротрофных микроорганизмов CO_2 может присоединяться только к восстановленному атому углерода (метильной группы пирувата) и только в сопряженных реакциях.

Определенную роль играет и глиоксилатный цикл, который у A. niger заменяет ЦТК при использовании им в качестве единственного источника углерода уксусной кислоты или этанола. В глиоксилатном цикле участвуют две молекулы ацетил-КоА, при окислении которых не выделяется диоксид углерода. Первая из молекул ацетил-КоА конденсируется с щавелевоуксусной кислотой, образуя лимонную кислоту, последовательно превращающуюся в цис-аконитовую и изолимонную кислоты. Из последней при участии фермента изоцитратлиазы (не нуждающегося в ацетил-КоА) получаются глиоксилевая $\left(\begin{matrix}O & & \\ & \diagdown\!\!\diagdown & \\ & & C{-}COOH \\ & \diagup & \\ H & & \end{matrix}\right)$ и янтарная кислоты. Эта реакция является ключевой в данном цикле.

Глиоксилевая кислота, конденсируясь со второй молекулой ацетил-КоА, образует яблочную кислоту. Реакция катализируется малатсинтетазой, действие которой аналогично действию цитратсинтетазы. Янтарная кислота вовлекается в цикл трикарбоновых кислот.

Глиоксилатный цикл значительно укорачивает путь от изолимонной к яблочной кислоте, минуя некоторые участки ЦТК, являющиеся источником предшественников аминокислот. Поэтому глиоксилатный цикл нередко называют глиоксилатным шунтом (см. схему ЦТК).

Функционирование глиоксилатного цикла у A. niger было доказано при использовании радиоактивного по углероду ацетата, который одновременно включался в соединения циклов трикарбоновых кислот и глиоксилатного. Среди продуктов реакции уже через 0,5 мин были обнаружены лимонная и яблочная кислоты. Из мицелия выделены изоцитратлиаза и малатсинтетаза, а также ферменты превращения глиоксиловой кислоты — глиоксалаттрансаминаза, глиоксилатредуктаза и фермент, осуществляющий конденсацию глиоксилевой и α-кетоглутаровой кислот.

МЕХАНИЗМ РЕГУЛИРОВАНИЯ БИОСИНТЕЗА ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

Органические кислоты, синтезируемые клеткой, являются интермедиатами — продуктами, которые, образовавшись, сразу же вступают в последующие реакции ЦТК. Сверхсинтез любого из интермедиатов приводит к накоплению его в клетке и выделению в среду. На этом, в частности, базируется и получение лимонной кислоты ферментацией сред с мелассой, сахарозой, глюкозой и н-алканами посредством микроскопических грибов, дрожжей и других микроорганизмов.

Механизм такого патологического обмена углерода и накопления лимонной микроорганизмами в ЦТК до сих пор остается неизученным. В принципе он должен сводиться к блокированию реакций, в которых используется лимонная кислота, или

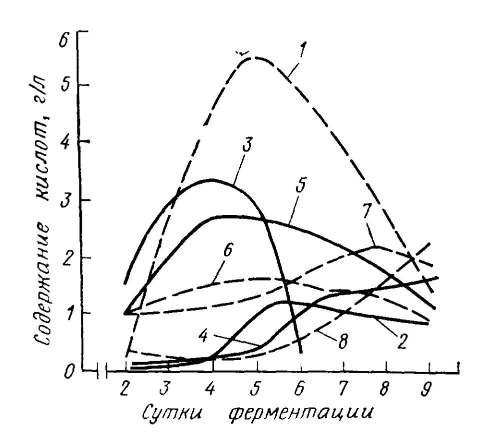


Рис. 11. Изменение состава органических кислот в процессе поверхностной ферментации мелассных сред:

1 — малоновая; 2 — *цис*-аконитовая; 3 — янтарная; 4 — фумаровая; 5 — яблочная; 6 — глюконовая; 7 — сахарная; 8 — щавелевая.

к повреждению регуляторных механизмов клетки. Большую роль в этом играет совокупность наследственных факторов родителей, т. е. определенные генетические изменения.

Большинство исследователей склоняется к мнению, что основную роль играет ингибирование ферментов — аконитатгидратазы и изоцитратдегидрогеназы. Ингибирование аконитатгидратазы объясняют действием самой лимонной кислоты или избытка гексацианоферроата калия, применяемого для обработки мелассных сред перед ферментацией [112]. Некоторую роль, по-видимому, играет пероксид водорода. По мнению Е. Брухмана, высокопродуктивные штаммы A. niger всегда характеризуются пониженной активностью каталазы. Предполагается, что изоцитратдегидрогеназа ингибируется теми же соединениями.

Другие исследователи, хотя и констатировали некоторое стимулирование кислотообразования гексацианоферроатом, но не подтвердили его участия в блокировании реакций ЦТК. Р. Я. Карклиньш, вводя в мелассную среду 0,09 % пероксида водорода, наоборот, наблюдал торможение кислотообразования [33]. Показано, что аконитатгидратаза и изоцитратдегидрогеназа присутствуют в мицелии A. niger с начала до конца ферментации, но активность их снижается задолго до накопления максимальной кислотности, причем второй из этих ферментов инактивируется быстрее первого.

При интенсивном кислотообразовании активность цитратсинтетазы возрастает приблизительно в десять раз. Однако по имеющимся данным еще нельзя решить вопрос, что является причиной накопления лимонной кислоты — ингибирование указанных двух ферментов или активирование цитратсинтетазы [114].

Известно (рис. 11 по [33]), что ко вторым суткам ферментации в среде, уже покрытой тонкой мицелиальной пленкой, в ощутимых количествах содержатся янтарная и яблочная кислоты, а также не относящиеся к ЦТК кислоты: глюконовая, сахарная и малоновая. Первые две кислоты образуются непосредственным окислением глюкозы, малоновая, по-видимому, как промежуточный продукт на пути синтеза насыщенных жирных кислот:

$$\text{Ацетил-КоА} \xrightarrow{+CO_2} \text{Малонил-КоА} \rightarrow \text{Малонат.}$$

Содержание всех этих кислот возрастает до третьих — пятых суток ферментации. Таким образом, ингибирование аконитатгидратазы и изоцитратдегидрогеназы начинают вызывать перечисленные выше кислоты, что вызывает постепенное накопление лимонной кислоты, которая в свою очередь еще больше ингибирует данные ферменты, и усиливает их синтез.

Следует обратить внимание еще на одного возможного участника в этом механизме — малоновую кислоту, являющуюся специфическим ингибитором сукцинатдегидрогеназы. Из графика рис. 11 видно, что малоновой кислоты образуется больше других кислот и содержание ее в среде возрастает до четвертых-пятых суток — времени начала наиболее интенсивного продуцирования лимонной кислоты.

В период интенсивного накопления лимонной кислоты в ЦТК преобладает анаплеротический путь метаболизма, т. е. сначала происходит карбоксилирование пировиноградной кислоты с образованием щавелевоуксусной, а затем конденсация ее с ацетил-КоА (см. схему). Интенсивность образования лимонной кислоты в этот период может быть понятна также из того, что в данном случае резко ограничиваются возможности конструктивного и энергетического обмена веществ клетки и A. niger для поддержания жизнеспособности вынужден перерабатывать значительно большее количество субстрата.

РАЗЛОЖЕНИЕ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ И ОБРАЗОВАНИЕ ПОБОЧНЫХ КИСЛОТ

Как показывает рис. 12, разложение лимонной кислоты при поверхностном способе ферментации начинается с восьмых суток, причем до исчерпывания сахара. Химизм разложения лимонной кислоты не изучен, по-видимому, она расходуется грибом на дыхание.

При этом в ЦТК активируются ферменты, разлагающие лимонную кислоту с одновременным резким снижением активности цитратсинтетазы. Глюконовая кислота образуется в основном при непосредственном окислении глюкозы при катализе глюкозооксидазой (с. 60). Не исключена возможность появления ее из глюкозо-6-фосфата через промежуточный γ-лактон и 6-фосфорноглюконовую кислоту, фосфорная кислота от которой отщепляется с присоединением воды (реакции катализируются особой дегидрогеназой и фосфатазой). Дальнейшее окисление глюконовой кислоты приводит к получению сахарной кислоты (карбоксильные группы при C_1 и C_6).

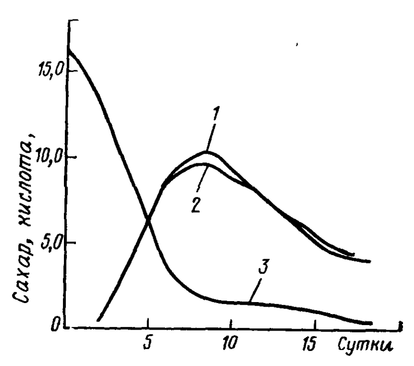


Рис. 12. Кинетика лимоннокислотной ферментации:
1 — общая кислотность; 2 — лимонная кислота; 3 — сахар.

Щавелевая кислота может образоваться несколькими путями, например, гидролизом щавелевоуксусной кислоты, катализируемым оксалоацетатгидратазой; окислением глиоксилевой кислоты, катализируемым глиоксилатоксидазой.

В дальнейшем все побочные кислоты с помощью ферментной системы A. niger могут быть превращены в лимонную кислоту.

ВЫХОД ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

Образование лимонной кислоты из сахара описывается следующим химическим уравнением:

$$\underset{342}{C_{12}O_{22}O_{11}} + \underset{96}{3O_2} \rightarrow \underset{384}{2C_6H_8O_7} + \underset{54}{3H_2O}.$$

Отсюда теоретический выход лимонной кислоты равен 112,2 %, или в виде $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, как это принято считать в производстве, 122,7 % к массе сахарозы.

Однако в процессе лимоннокислой ферментации сахар расходуется еще на синтез клеточной массы гриба, его дыхание и образование побочных органических кислот, главным образом щавелевой и глюконовой, что не учитывается этим уравнением. Кроме того, некоторое количество сахара остается неиспользованным.

С одной стороны, гриб должен образовывать достаточное количество клеточного материала, причем ему для этого открыт в основном только путь от глюкозы до лимонной кислоты; с другой — ферментационные процессы дальнейшего расщепления лимонной кислоты должны быть так заторможены, чтобы она оставалась конечным продуктом. Процессы, которые ведут к такому торможению, еще не известны и в этом состоит вся проблема [91].

Уравнение образования лимонной кислоты может быть записано так [110]:

$$C_6H_{12}O_6 + H_2O \rightarrow C_6H_8O_7 + 6H.$$

Предполагая, что окисление каждых двух атомов водорода вызывает образование трех связей высокой энергии (АДФ→АТФ), можно написать

$$6H + 1,5O_2 + 9АДФ \rightarrow 3H_2O + 9АТФ,$$

или суммарно превращение глюкозы в лимонную кислоту:

$$C_6H_{12}O_6 + 1,5O_2 + 9АДФ \rightarrow C_6H_8O_7 + 2H_2O + 9АТФ.$$

При полном окислении глюкозы

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 + 3АДФ \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + 36АТФ.$$

По этому уравнению для окисления одной молекул глюкозы необходимо 12 атомов кислорода, следовательно, образуется $12 \cdot 3 = 36$ макроэргических связей (АТФ).

Справедливо также уравнение для синтеза клеточного вещества и затраты на него энергии:

$$C_6H_{12}O_6 + 36АТФ \rightarrow 6(CH_2O) + 36АДФ,$$

где (CH_2O) — клеточное вещество.

Так как в процессе синтеза лимонной кислоты образуется в четыре раза меньше молекул АТФ, чем при полном окислении гексозы, то материальный баланс лимоннокислотной ферментации и энергетический баланс могут быть представлены в следующем виде:

$$C_6H_{12}O_6 + 1,5O_2 + 9АДФ \rightarrow C_6H_8O_7 + 2H_2O + 9АТФ;$$

$$\frac{1}{4}C_6H_{12}O_6 + 9АТФ \rightarrow \frac{6}{4}(CH_2O) + 9АДФ.$$

Складывая эти уравнения и приводя их к общему знаменателю, получаем:

$$5C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 4C_6H_8O_7 + 8H_2O + 6(CH_2O).$$

Отсюда наибольший выход лимонной кислоты из ферментированного сахара составляет 4 моля из 5 молей гексозы, или 85,3 % к глюкозе (89,6 % к сахарозе), а в пересчете на моногидратную кислоту 93,0 % к глюкозе (97,7 % к сахарозе).

Расход сахара сильно зависит от условий ферментации [42]. Из уравнения реакции на 1 г лимонной кислоты расходуется 0,891 г сахарозы. Затраты сахара на синтез биомассы гриба были определены исходя из среднего содержания углерода в ней, равного 46 %. В 100 г сахарозы содержится 42,3 г углерода; на синтез 1 г сухого мицелия должно расходоваться около 1,1 г сахарозы. Расход сахарозы на дыхание гриба вычислен по разности между введенным количеством ее и затратами на образование органических кислот, синтез биомассы и оставшейся неиспользованной. Меласса № 1 имела хорошие ферментационные показатели, меласса № 2 — плохие. Продолжительность поверхностной ферментации — 9 суток.

Как видно из табл. 20 и 21, выход лимонной кислоты в условиях поверхностной ферментации может достигать 80 : 0,891 = = 89,79 %, или в виде моногидрата 97,87 % [42].

Фактически, по одним данным [33], при поверхностном способе ферментации на синтез биомассы мицелия затрачивается 10—15 % сахара, на образование лимонной кислоты 48—50 %, на дыхание гриба и образование побочных кислот — остальное количество; по другим [24] при поверхностном и глубинном способах ферментации затрачиваются одинаковые количества, составляющие: на синтез биомассы мицелия 16,2 %, на образование кислот 43,9 %, на дыхание 37,9 %, неучтенный остаток 2 %. Таким образом, процесс лимоннокислой ферментации на заводах осуществляется еще довольно несовершенно.

Таблица 20

Расход сахара (% от введенного) при высоте слоя среды 12 см

Концентрация сахара в среде, г/л	На образование				На дыхание гриба	Осталось непотребленным
	кислот (всего)	в том числе		биомассы		
		лимонной	побочных			
Меласса № 1						
100,2	80,5	80,0	0,5	4,5	5,1	9,9
120,0	79,5	78,9	0,6	5,6	3,3	11,6
140,0	75,9	75,3	0,6	5,8	5,8	12,5
160,1	69,2	68,5	0,7	6,1	11,7	13,0
180,3	58,3	57,2	1,1	5,6	23,6	12,5
200,3	49,2	47,3	1,9	5,0	33,1	12,7
220,2	43,5	40,2	3,3	4,5	37,4	14,6
Меласса № 2						
100,2	71,5	70,2	1,3	5,3	11,5	11,7
120,0	68,6	67,3	1,3	5,4	13,0	13,0
140,1	60,0	59,1	0,9	5,2	22,5	12,3
160,2	49,3	47,9	1,4	4,3	30,0	16,4
180,0	41,9	39,2	2,7	3,1	40,2	14,8
200,0	32,0	29,5	2,5	2,6	51,4	14,0
220,0	23,5	20,8	2,7	2,2	53,8	20,5

Таблица 21

Расход сахара (% от введенного) при исходной концентрации сахара в среде 130 г/л

Высота слоя среды, см	На образование				На дыхание гриба	Осталось непотребленным
	кислот (всего)	в том числе		биомассы		
		лимонной	побочных			
Меласса № 1						
8	81,2	80,0	1,2	6,7	4,8	7,3
12	74,6	73,7	0,9	7,8	6,9	10,7
16	71,4	69,0	2,4	7,5	7,0	14,1
19,5	62,0	59,4	2,6	6,5	15,9	15,6
Меласса № 2						
8	72,0	70,9	1,1	5,7	11,7	10,6
12	68,9	67,1	1,8	5,9	8,8	16,3
16	60,1	58,8	1,3	5,2	14,3	20,4
19,5	42,1	41,0	1,1	4,6	30,4	22,9

Глава 6. ПРИГОТОВЛЕНИЕ МЕЛАССНОЙ СРЕДЫ

МЕЛАССА КАК ИСХОДНОЕ СЫРЬЕ

Меласса — оттек (маточный раствор), получающийся при отделении кристаллов сахарозы на центрифугах от последней кристаллизации. В мелассе содержатся несахара сока сахарной свеклы или сахарного тростника, не удаляемые при его химической очистке, и сахароза, которую методом кристаллизации выделять уже экономически невыгодно. При выработке сахара выход мелассы в расчете на безводную колеблется от 3 до 6 % к массе сахарной свеклы. С мелассой отходит от 10 до 15 % всего сахара, содержащегося в перерабатываемой свекле.

В соответствии с видом исходного сырья для производства сахара различают свекловичную и тростниковую мелассу. В СССР сахарный тростник не произрастает, но на свеклосахарных и сахарорафинадных заводах перерабатывают импортный тростниковый сахар-сырец на белый сахар-песок и сахар-рафинад. В первом случае получаемую мелассу называют сырцовой; во втором случае, независимо от исходного сырья, — рафинадной патокой. Производство мелассы в СССР составляет около 4,5 млн. т в год.

Химический состав свекловичной мелассы

По внешнему виду свекловичная меласса представляет собой густую вязкую жидкость темно-коричневого цвета со специфическим запахом, обусловленным в основном присутствием триметиламина и диметилсульфида. Это — лучшее сырье для производства. Ценность его заключается в том, что наряду с высоким содержанием сахара в мелассе содержатся все вещества, необходимые для нормальной жизнедеятельности гриба. Выход лимонной кислоты при использовании ее — наибольший.

Меласса имеет сложный и непостоянный химический состав, зависящий от почвенно-климатических условий вегетации свеклы, вносимых удобрений, способов уборки, условий и продолжительности хранения, технологии сахароварения и др. Например, механизированная уборка свеклы, транспортировка, доочистка и складирование травмируют корни, способствуя их загниванию при хранении. Корни с не полностью обрезанными головками склонны к прорастанию. Все это ухудшает качество свеклы и мелассы.

В мелассе содержится в среднем 80 % сухих веществ и 20 % воды. Учитывая состав мелассы, можно предполагать, что значительная часть воды находится в связанном состоянии вследствие гидратации в растворе коллоидов, молекул сахарозы и ионов минеральных веществ.

С у х и е в е щ е с т в а. Общее содержание сухих веществ в мелассе непосредственно после фуговки утфеля на сахарном заводе составляет около 85 %. Реализуемая (товарная) меласса имеет несколько меньшую концентрацию, так как разбавляется водой и конденсатом при промывании и пропаривании трубопроводов, по которым она транспортируется в баки-хранилища. Снижение

концентрации препятствует образованию кристаллов сахара при хранении, уменьшает вязкость, что облегчает отгрузку мелассы, особенно в холодное время года, и зачистку баков.

По данным УкрНИИСПа, содержание сухих веществ в мелассах в первом полугодии колебалось в пределах 67,1—84,7 %, в среднем составляя 78,0 %; во втором полугодии 78,9—84,0, в среднем 80,2 %. Наиболее часто содержание сухих веществ колеблется в пределах 75—78 %.

Сухие вещества мелассы слагаются из следующих компонентов (в среднем, % мас.): сахарозы 60,0, безазотистых органических веществ 16,7, азотистых веществ 14,8 и минеральных веществ (золы) 8,5. В свеклосахарном производстве учет ведут по сахарозе — основному продукту, в соответствии с чем другие сахара относят к группе безазотистых органических веществ. В лимоннокислотном производстве учитывают все сахара, полностью или частично используемые грибом, и сумму их называют «ферментируемые сахара».

Сахароза и ферментируемые сахара. Содержание сахарозы колеблется от 48 до 56 % к массе мелассы и сильно зависит от состава несахаров свеклы. Оно больше при переработке свежей здоровой свеклы, чем порченой, долго хранившейся. Принято считать, что меласса должна быть раствором, насыщенным сахарозой, однако практически она является несколько пересыщенным раствором, поскольку в производстве кристаллизация ограничена временем. Кроме того, на содержание сахарозы существенно влияют исходная плотность сиропа и конечная температура кристаллизации: чем выше первая и ниже вторая (в допустимых пределах), тем меньше в мелассе остается сахара.

Содержание инвертного сахара изменяется в пределах 0,4—1,5 % к массе мелассы. При переработке долголежалой и порченой свеклы, а также при хранении мелассы в неблагоприятных условиях содержание в ней инвертного сахара может резко возрасти. Из трисахаридов присутствуют раффиноза (0,5—2,0 %), кестоза и неокестоза (0,5—1,6 %), плантеоза (0,02 %). Раффиноза переходит в мелассу из свеклы, кестоза и неокестоза образуются в результате деятельности микроорганизмов в процессе сахарного производства. Тетрасахариды представлены небольшим количеством стахиозы (0,02 %). Из пектиновых веществ в мелассу переходят главным образом арабиноза, ксилоза и манноза (0,5—1,5 %). Тетрагалактуроновая кислота осаждается на дефекации.

Безазотистые органические вещества. Как уже указывалось, в сахарном производстве к ним относят все сахара мелассы, за исключением сахарозы, продукты химической и термической деструкции сахаров и органические кислоты.

Инвертный сахар, особенно фруктоза, в щелочных растворах сахарного производства при нагревании быстро разлагается. Вначале вследствие кетоенольной таутомерии происходят взаимные превращения глюкозы и фруктозы и образование новых моноз, например маннозы и психозы. При разложении моносахаридов

образуются нелетучие, окрашенные в коричневый цвет кислоты: глюциновая, апоглюциновая, сахарумовая, меляссиновая и более высокомолекулярные гуминовые кислоты, некоторое количество молочной и летучих кислот — муравьиной и уксусной.

Карамели — групповое название сложной смеси продуктов, образующихся при термическом разложении сахарозы и моносахаридов. В состав карамелей входят ангидриды сахаров и темноокрашенные соединения. К ним примыкают меланоидины — другая сложная смесь, образующаяся в горячих растворах при химическом взаимодействии редуцирующих сахаров с аминокислотами. Кроме нелетучих темноокрашенных соединений, в этой смеси содержатся алифатические альдегиды, метилглиоксаль, диацетил, ацетоин, ацетон, оксиметилфурфурол и другие, всего около 40 летучих соединений. Оксиметилфурфурол найден в плохоферментируемых мелассах. Добавление его заметно снижает выход лимонной кислоты, однако в конце ферментации он не обнаруживается [23].

Меланины образуются в диффузионном соке в результате ферментативного окисления ароматических веществ (тирозина, пирокатехина), в мелассу практически не попадают, так как бóльшая часть их осаждается на дефекации. Соотношение отдельных групп красящих веществ в мелассе варьирует в значительных пределах, но всегда преобладают красящие вещества щелочного разложения сахара (около 70 %).

У всех красящих веществ наблюдается увеличение интенсивности окраски с повышением pH. В них присутствуют карбонильные и карбоксильные группы, благодаря чему они способны соответственно редуцировать окисленные соединения и проявлять кислотные свойства. Некоторые функциональные группы могут обратимо окисляться и восстанавливаться и влиять на окислительно-восстановительный потенциал растворов. При щелочном разложении сахаров они имеют отрицательный электрокинетический потенциал, при образовании меланоидинов — положительный, что обусловливает их способность адсорбироваться.

Цветность мелассы колеблется в пределах от 1,2 до 4,6 (чаще находится около 2,0) мл 0,1 н. раствора иода, которое надо добавить к 94 мл воды, чтобы получить интенсивность окраски, равную 2%-ному раствору мелассы. Четко выраженной зависимости между содержанием красящих веществ в мелассе и ее технологическим качеством не установлено [102]. Ухудшение качества меласс наблюдалось лишь в сильно окрашенных, полученных в конце сезона сахароварения при переработке долголежалой свеклы, когда в мелассе в значительных количествах содержались и другие неидентифицированные ингибиторы ферментации.

В мелассе содержится от 4 до 6 % коллоидов. Необратимые коллоиды после осаждения спиртом или спирто-эфирной смесью вновь не растворяются в воде, окрашены в интенсивный темно-коричневый цвет (обусловливая до 85 % цветности мелассы) и

содержат около 9 % азота. Обратимые коллоиды растворяются в воде, окрашены менее интенсивно, беднее азотом (около 4 %). Основная масса коллоидов — обратимые. Органическая часть, составляющая 90—95 % массы коллоидов, мало изучена. В обратимых коллоидах присутствует около 25 % арабана и некоторое количество гексозанов. Значительную долю в составе коллоидов занимают высокомолекулярные окрашенные соединения.

Коллоиды с отрицательным электрокинетическим потенциалом коагулируют в кислой среде (pH 3,2, концентрация сухих веществ мелассы 20—30 %, температура 80 °C), коллоиды с положительным зарядом — в щелочной среде с pH 8 и выше. Присутствие коллоидов снижает выход лимонной кислоты.

Бóльшая часть органических кислот свеклы, образующих с гидроокисью кальция нерастворимые соли (щавелевая, лимонная, оксилимонная, винная), удаляются на дефекации. В мелассу переходят в основном неосаждаемые известью кислоты — глутаровая, малоновая, адипиновая, янтарная, трикарбаллиловая, аконитовая, гликолевая, молочная, глиоксилевая и яблочная. Из нелетучих жирных кислот обнаружены следы капроновой, каприловой, каприновой, лауриновой, миристиновой и пальмитиновой. К нелетучим кислотам относятся и рассмотренные выше окрашенные кислоты.

Из летучих кислот присутствуют муравьиная (0,1—1,2 %), уксусная (0,6—1,3 %), пропионовая (0,02—0,3), н-масляная (0,04—0,3 %), н-валериановая (до 0,02 %) и около 20 кислот ароматического ряда (следы). Уксусная кислота образуется при щелочном разложении пектиновых веществ и моносахаридов на дефекации, но бóльшая часть ее и других летучих кислот образуется в результате жизнедеятельности микроорганизмов. Практически все летучие и нелетучие кислоты находятся в мелассе в виде солей калия и кальция. Большое содержание летучих кислот свидетельствует о сильной обсемененности мелассы кислотообразующими бактериями. Летучие кислоты снижают выход лимонной кислоты, однако содержание их до 1 % к массе мелассы не оказывает отрицательного влияния.

Азотистые вещества содержатся в количестве от 0,8 до 2,7 % к массе мелассы (в пересчете на азот). Содержание их зависит от количества внесенных под свеклу азотных удобрений, выпавших осадков и температуры в период вегетации, а также от продолжительности хранения свеклы. Содержание азота в мелассе повышается с увеличением дозы удобрений и уменьшается с возрастанием количества осадков, понижением температуры и с увеличением продолжительности хранения свеклы.

По соотношению отдельных форм азота мелассы сильно различаются. В зарубежных мелассах содержится в среднем 32 % аминного азота, 63 % бетаинного, 4 % белкового и около 1 % амидного, аммиачного и нитратного [52]. В мелассах сахарных заводов Украины среднее содержание (в %): аминного азота 8,2, бетаинного 73,9, белкового 3,0, пептонного 1,9 и нитратного 2,0.

Нередко аминный азот составляет около 20 %. В мелассах Прибалтийских сахарных заводов азота (в %): аминного 1, бетаинного 52, белкового 45 и прочего 2 [13].

Состав аминокислот мелассы приведен ниже и в табл. 22 (прибалтийские сахарные заводы).

Состав аминокислот (% к массе свекловичной мелассы Украины)

Лейцин+изолейцин	1,7—2,9	Аланин	1,2—2,3
Фенилаланин	Следы	Треонин+глицин	0,2—0,8
Валин+метионин+ +триптофан	0,4—1,3	Глютаминовая кислота	1,3—1,8
		Серин	1,7—2,5
γ-Аминомасляная кислота	1,2—1,8	Аспарагиновая кислота	0,3—0,5
		Аргинин+гистидин+ +лизин	Следы
Тирозин	0,6—0,8		
Пролин	Следы	Цистин	Следы

Таблица 22

Состав аминокислот свекловичной мелассы сахарных заводов Прибалтики (в % от общей суммы аминокислот)

Аминокислоты	Образцы мелассы				
	1	2	3	4	5
Глютаминовая	78,1	78,6	77,5	78,1	78,0
Аланин	3,0	3,0	3,2	3,1	3,0
Аспарагиновая	5,2	5,0	3,4	3,5	3,8
Лизин	1,6	1,8	2,0	2,1	2,1
Лейцин	2,3	2,4	2,2	2,3	2,3
Пролин	0,6	0,7	0,7	0,6	0,8
Аргинин	0,1	Следы	0,1	0,1	0,1
Глицин	1,7	2,1	2,0	1,8	1,8
Валин	1,3	1,6	1,6	1,6	1,6
Гистидин	0,3	0,5	0,3	0,5	0,2
Серин	1,6	1,8	1,8	1,5	1,5
Метионин	0,1	Следы	0,2	0,2	0,1
Треонин	0,6	0,6	0,7	0,5	0,6
Изолейцин	2,1	1,9	2,2	2,2	2,2
Тирозин	1,4	1,5	1,6	1,6	1,6
Фенилаланин	Следы	0,5	0,5	0,3	0,3

Аминокислоты переходят в мелассу из свеклы только на 50—60 %. γ-Аминомасляная кислота не содержится в свекле и образуется в процессе сахарного производства из глютаминовой кислоты при ее декарбоксилировании. Глютаминовая кислота легко отщепляет воду, превращаясь в циклическую пирролидонкарбоновую кислоту, в виде которой она в основном (на 75 %) и находится в мелассе.

Бетаин свеклы практически полностью сосредоточивается в мелассе. Амиды — аспарагин и глютамин, содержащиеся в свекле, под влиянием щелочи гидролизуются (омыляются) до аммиака и соответствующей аминокислоты. В небольших количествах в

мелассе содержатся летучие амины, образующиеся при частичном распаде бетаина, и упомянутые выше меланоидины.

Минеральные вещества. Среднее содержание минеральных веществ 8,5 % соответствует так называемой «чистой» золе, т. е. сумме окислов. «Карбонатной» золы, в виде которой она получается при обычном озолении, будет больше — около 14 %. Для ускорения сжигания добавляют концентрированную серную кислоту, получая «сульфатную» золу; ее будет еще несколько больше (карбонатная зола=сульфатной×0,9).

В чистой золе отечественных меласс содержится около 40 % K_2O, от 1,5 до 4,5 % MgO и 7,3—13,8 % CaO к массе золы. В зарубежных мелассах содержание K_2O выше (66—73 %), а содержание окислов магния и кальция ниже (около 1 % MgO и 4,5—7,0 % CaO). Меньшее содержание K_2O в первых мелассах объясняется недостатком калия в свекле и соответственно в почве, что вызывает низкую натуральную щелочность соков в сахарном производстве. Повышенное содержание солей кальция и магния связано с переработкой на сахарных заводах нестандартной свеклы, в диффузионном соке из которой больше не осаждаемых известью органических кислот, а также с обработкой свеклы, поступающей на резку, хлорной известью.

Около 97 % содержащегося в свекле фосфора теряется в процессе сахарного производства (осаждается в основном на дефекации). При переработке здоровой свеклы с нормальной натуральной щелочностью в чистой золе содержится 0,2—0,6 % P_2O_5, или 0,02—0,06 % к массе мелассы. В последние годы вследствие снижения натуральной щелочности свеклы до 0,01 % CaO и менее на многих сахарных заводах с целью более полной очистки соков от растворимых кальциевых солей, коллоидных веществ и предотвращения инверсии сахарозы сок II сатурации подщелачивают тринатрийфосфатом (10—15 кг на 100 т свеклы) до pH 8,3—8,5. Клеровку также обрабатывают тринатрийфосфатом. При этом содержание фосфора в мелассе резко возрастает — до 1,2—2,0 % P_2O_5 по массе золы или до 0,12—0,20 % к массе мелассы.

В данном случае при обработке мелассы гексацианоферроатом калия свободные ионы его появляются раньше, чем будет добавлена оптимальная доза. Это объясняется тем, что тяжелые металлы находятся в мелассном растворе в виде малорастворимых фосфатов (при избытке фосфора) или в виде комплексных соединений с амино- и оксикислотами. Таким образом, необходимые для роста гриба фосфор и железо недоступны, а реакция с гексацианоферроатом крайне затруднена. Возможно, это повышает буферность и снижает ферментируемость мелассы в лимонную кислоту [45]. Использование в сахарном производстве кальцинированной соды вместо тринатрийфосфата не только не снижает, но, наоборот, повышает содержание растворенных коллоидов в соке и незначительно осаждает соли кальция, поэтому исключение тринатрийфосфата из технологии сахарного производства невозможно.

Содержание сульфитов изменяется от 0,05 до 0,2 % в расчете на диоксид серы и к массе мелассы. Оно возрастает с усилением сульфитации сиропа или сока II сатурации с целью снижения цветности и вязкости сахарных растворов. В условиях поверхностной ферментации сульфиты задерживают прорастание конидий и развитие A. niger. Это особенно ощутимо сказывается при одновременном снижении pH мелассного раствора. Так, при содержании 0,04 % SO_2 и pH 5 мицелий вырастает лишь к концу вторых суток, а при pH 3 вообще не вырастает. При бóльших концентрациях сульфита конидии не прорастают даже при pH 7. Однако сульфиты не оказывают отрицательного влияния на выросший мицелий и биосинтез лимонной кислоты (Г. И. Журавский).

В мелассе присутствуют микроэлементы, количество которых сильно колеблется, что может отражаться как на росте гриба, так и на выходе лимонной кислоты. Элементы — алюминий, железо, кремний и стронций — могут содержаться как в макро-, так и в микроколичествах.

Содержание микроэлементов в свекловичных мелассах (мг/100 г мелассы)

Никель	0,16—0,76	Медь	0,0—9,8
Кобальт	0,10—0,76	Титан	0,21—0,70
Фтор	0,21—0,70	Магний	5,68—8,64
Молибден	0,10—0,12	Марганец	1,4—7,6
Свинец	0,21—0,61	Стронций	4,6—59,4
Олово	0,10—0,40	Алюминий	9,3—60,0
Бор	0,20—0,42	Железо	8,3—26,6
Цинк	2,0—3,3	Кремний	6,6—54,7

Наличие в мелассе солей сильных оснований и слабых кислот придает ей буферные свойства. Буферная емкость характеризуется количеством 1 н. раствора серной кислоты в миллилитрах, необходимым для снижения величины pH с 5 до 3 в 100 г мелассы при разведении водой (1 : 1). Обычно она равна 60—95 мл. В отличие от спиртового и дрожжевого производства для производства лимонной кислоты предпочтительна меласса с малой буферностью, позволяющей грибу-кислотообразователю быстрее снизить pH и осуществить ферментацию с минимальным образованием побочных кислот.

Кислотность. Нормальная меласса имеет слабощелочную или близкую к нейтральной реакцию (pH 8,9—7,2) и щелочность 2—0,5° (1° щелочности эквивалентен 1 мл 1 н. раствора серной кислоты, израсходованной на нейтрализацию 100 г мелассы), обусловленную карбонатами. Слабокислая реакция чаще является следствием качества сахарной свеклы (малая натуральная щелочность, дефектность) и связанной с ним технологии сахароварения.

До недавнего времени одним из основных критериев пригодности мелассы для производства лимонной кислоты считалась величина pH, равная 7 и более. Однако уже в 60-х годах на

заводы начала поступать меласса с pH 6,2—6,8, а в настоящее время pH ее менее 6. Какой-либо ясно выраженной зависимости между величиной pH мелассы и ее ферментируемостью в лимонную кислоту не установлено.

Витамины. В мелассе содержатся следующие витамины (мг/100 г):

Биотин	0,0035—0,0060	Никотиновая кислота	3,90—5,20
Тиамин	0,18—0,28	Пантотеновая кислота	0,06—0,25
Рибофлавин	0,02—0,08	Фолиевая кислота	0,01—0,03
Пиридоксин	0,30—0,45	Инозит	90—120

Содержание витаминов сильно колеблется.

Посторонние примеси. К ним относятся загрязнения нефтепродуктами из-за недостаточно тщательной подготовки цистерн для перевозки мелассы по железной дороге и пеногасители, применяемые в сахарном производстве на диффузии и при упаривании соков. В мелассу, по-видимому, переходит также некоторая часть пестицидов, применяемых для борьбы с насекомыми-вредителями и микробами—возбудителями болезней во время культивирования свеклы, дефолиантов и десикантов, добавляемых при хранении свеклы с целью предупреждения прорастания. Они обладают мутагенными и токсичными свойствами. Количество примесей иногда может достигать значительной величины, например, пеногасителей до 5 % к массе мелассы. Жироподобные вещества, всплывая на поверхность мелассного раствора, обволакивают конидии и мицелий, затрудняя обмен веществ гриба.

Меласса, пригодная для производства лимонной кислоты, должна удовлетворять следующим требованиям: содержать сухих веществ не менее 75 %; сахара по прямой поляризации не менее 46 %; инвертного сахара не более 1 %; окиси кальция не более 0,7; диоксида серы не более 0,03 %; P_2O_5 не более 0,05 %; жироподобных веществ не более 0,5 %. Величина pH должна быть не ниже 6,5. Перечисленные показатели технологического качества мелассы, однако, еще не могут служить надежным критерием ее пригодности для производства лимонной кислоты, и окончательное заключение об этом может быть сделано только по результатам биохимического испытания (опытной ферментации).

Химический состав тростниковой и сырцовой мелассы

Тростниковая меласса сильно отличается от свекловичной: в ней меньше сахарозы при одновременно очень большом содержании инвертного сахара, мало азота, раффинозы, выше цветность, пониженная буферность, реакция слабокислая (pH 4,5—6,0 при разбавлении 1 : 1). Запах — кисловатый, напоминающий фруктовый. Большое содержание инвертного сахара в мелассе объясняется значительным содержанием его в исходном сырье. Для производства лимонной кислоты она менее пригодна, чем свекловичная меласса.

Средний состав тростниковой мелассы приведен ниже [52].

Химический состав тростниковой мелассы (% к массе)

Сухие вещества	80	MgO	0,1
Сахароза	42	SiO_2	0,5
Инвертный сахар	20	SO_3	1,6
Органические несахара	10	Cl_2	0,4
«Чистая» зола	8	$Na_2O+Fe_2O_3+Al_2O_3$	0,2
В том числе:		P_2O_5	0,2
K_2O	3,5		
CaO	1,5		

Из безазотистых органических несахаров много аконитовой кислоты — 3—7 % по массе сухой мелассы, летучих кислот — 0,6—0,9 %. Буферная емкость меньше, чем у свекловичной мелассы. Содержание общего азота колеблется от 0,5 до 1,6 %, аминного (без гидролиза) 0,2—0,5 %. В составе аминокислот преобладает аспарагиновая. Бетаин и глютаминовая кислота отсутствуют. Количество коллоидов изменяется от 2 до 8 %.

Среднее содержание витаминов (мг/100 г): тиамин 0,16, рибофлавин до 0,30, пиридоксин около 1,15, никотиновая кислота 2,10, пантотеновая кислота 3,60, фолиевая кислота 0,06, биотин 0,13, инозит 158.

Сырцовая меласса получается при переработке тростникового сахара-сырца, объем которой из года в год растет и проводится после завершения переработки свеклы. Сырцовая меласса содержит от 79 до 81 % сухих веществ и имеет pH от 5,6 до 7,5 (чаще около 6,5). Содержание сахара: по прямой поляризации 41,3—47,7 %, инвертного сахара 0,7—4,7 (обычно 1—1,5 %), рафинозы около 2 %. Сумма сбраживаемых сахаров в среднем 44 %. Доброкачественность — от 48 до 58 %. Содержание общего азота 0,14—0,29 %, минеральных веществ 10—12,6 %, в том числе K_2O 2,2—3,2 %, CaO 1,47—3 %, MgO — от 0,32 до 2,4 % (обычно около 1 %). Содержание диоксида серы — от 0,001 до 0,01 % (чаще 0,003 %). Цветность — от 0,6 до 6 (чаще около 2) мл 0,1 н. раствора иода (ВНИИХП).

Физико-химические свойства мелассных растворов

Плотность ρ в зависимости от содержания сухих веществ и температуры находится по уравнению [83]:

$$\rho = 1007{,}3 + 4{,}11\,(\text{СВ} - 0{,}11t)\ \text{кг/м}^3,$$

где СВ — содержание сухих веществ в растворе, %; t — температура мелассы, °С.

Формула справедлива в диапазоне температур от 20 до 120 °С и концентрации сухих веществ 5—50 %.

Динамическая вязкость в зависимости от тех же факторов описывается уравнением

$$\eta = (2{,}7 + 0{,}192\text{СВ})\, t^{-m},$$

где $m=0{,}426$ при СВ=7—15 %; 0,473 при СВ=15÷27 %.

При СВ=75 и 79 % зависимости имеют вид соответственно

$$\eta = 5400t^{-2,8668}; \quad \eta = 198{,}4 \cdot 10^3 t^{-3,2757}.$$

Зависимость поверхностного натяжения σ от температуры и содержания сухих веществ выражается следующим уравнением:

$$\sigma = 75 - 0{,}183\,(1{,}46\text{СВ} + t)$$

и действительна при тех же температурах и СВ=7÷45 %.

Зависимость между теплоемкостью, концентрацией, температурой и доброкачественностью мелассы дает уравнение:

$$C = 1 - [0{,}6 - 0{,}0018t + 0{,}0011\,(100 - R)]\,\frac{\text{СВ}}{100} \cdot 4{,}1868,$$

где C — удельная теплоемкость, кДж/(кг·°С), t — температура, °С; СВ — содержание сухих веществ в растворе, % мас.; R — доброкачественность — содержание сахара в 100 частях массы мелассы, % мас.

Меласса при разбавлении испытывает контракцию, величина которой больше, чем чистой сахарозы, примерно на 2—3 % и колеблется в пределах 6,5—8,2 %.

Микрофлора мелассы

В той или иной мере меласса всегда обсеменена микроорганизмами. Меласса с содержанием более 10 тыс. клеток в 1 г встречается редко, однако иногда наблюдаются отклонения и количество клеток достигает 25 тыс.

Обычно в мелассе обнаруживаются следующие микроорганизмы: бациллы, кислото- и газообразующие бактерии, кокки, дрожжеподобные и плесневые грибы, реже — актиномицеты. Спороносящие бактерии (бациллы) составляют обычно более 90 % всей микрофлоры мелассы. Одной клетке соответствует одна спора, поэтому спорообразование у бактерий не связано, как у грибов, с процессом размножения, а является лишь способом выживания в неблагоприятных условиях. Среди них найдены: Bac. subtilis (сенная палочка), Bac mesentericus (картофельная палочка) и ее разновидности Bac. mesent. flavus, Bac. mesent. globigii, Bac. mesent. panis vicosi, Bac. mesent. fuscul; Bac. megaterium, Bac. mycoides, Bac. aureus, Bac. circulans.

Бациллы попадают в мелассу из сахарной свеклы. Bac. subtilis, Bac. mesentericus, Bac. megaterium потребляют сахар с образованием кислот и газов. При отсутствии или недостатке молекулярного кислорода удовлетворяют свои энергетические потребности за счет восстановления нитратов в нитриты. Bac. mesent. globigii образует слизистые колонии и газ.

Споры Bac. subtilis и Bac. mesentericus выдерживают двухчасовое кипячение и отмирают лишь через 25 мин при температуре 125 °С. Споры Bac. mycoides выдерживают кипячение в течение 3—10 мин, споры Bac. megaterium — 15 мин. Вегетативные клетки бактерий погибают уже при кратковременном нагревании до 100 °С. Bac. subtilis и Bac. mesentericus чувствительны к реакции среды, предпочитают нейтральную реакцию, но могут размножаться и при pH 6—5. Хотя и в меньшей мере, чем Bac. megaterium, Bac. mesentericus и ее разновидности вредны главным образом нитритобразующей способностью. Нитриты очень ядовиты; при концентрации в среде 0,05 % NO_2 задерживается рост мицелия и снижается образование лимонной кислоты почти на 50 %, при концентрации 0,13 % NO_2 мицелий чернеет, намокает и погибает. Токсичность нитритов зависит от величины pH и при низких значениях pH достигает максимума.

Обычно нитриты не содержатся в мелассе, хотя качественная биологическая проба на наличие нитритобразующих бактерий почти всегда дает положитель-

ные результаты. Нитриты могут образовываться в кюветах и основных ферментаторах. Небольшая концентрация среды создает благоприятные условия для размножения бактерий, а при недостаточной аэрации, когда A. niger использует весь растворенный в среде кислород, нитритобразующие бактерии добывают кислород, необходимый им для окисления органических соединений, из нитратов с помощью активирующегося фермента нитраторедуктазы.

Из неспороносящих микроорганизмов наиболее сильными антагонистами A. niger являются разнообразные представители группы кишечной палочки (Esch. coli, Pseudomonas и другие). Это — факультативные анаэробы, отличающиеся большой приспособляемостью к условиям внешней среды и широкой изменчивостью ферментативных свойств под влиянием условий. Одна кишечная палочка в благоприятных условиях размножается каждые 15 мин, а потомство 1 клетки через 24 ч достигает 24 млрд. в 1 $мм^3$. Они предпочитают нейтральную среду, но устойчивы и при значениях pH, меньших 7 (хотя по мере подкисления среды размножение бактерий тормозится). Развиваются в широком интервале температур — от 20 до 40 °C. Обладают высокой биохимической активностью. Разлагают сахарозу и инвертный сахар с образованием уксусной и молочной кислот, этилового спирта, водорода, диоксида углерода; редуцируют нитраты в нитриты; протеолитическая способность выражена слабо.

Гетероферментативные молочнокислые бактерии представлены главным образом Leuconostoc mesenteroides и L. agglutinans, попадающими в мелассу из свеклы, иногда размножающимися в полупродуктах сахарного производства. Это короткие палочки, почти кокки, превращающие сахара в декстран, образующий слизистые капсулы, благодаря чему они выдерживают нагревание до 90 °C и даже непродолжительное кипячение. Кроме декстрана, они продуцируют муравьиную, уксусную и пропионовую кислоты.

Из дрожжеподобных грибов в мелассе встречаются Candida tropicalis, C. mycoderma, C. guilliermondii, C. scottii, Torula nigra и некоторые другие. Дрожжеподобные грибы рода Candida относятся к термотолерантным организмам (размножаются в интервале температур 4—55 °C). Источником углерода для них служат сахар и органические кислоты. Не требовательны к источникам азота, развиваются при pH 3—8 (оптимальный pH 5). Микроскопические грибы — Penicillium, Aspergillus, Oidium, Mucor и актиномицеты встречаются редко.

ЗАГОТОВКА МЕЛАССЫ

Мелассу заготавливают на сахарных заводах на основании предварительных испытаний по ферментации, в конце сентября — ноябре. Меласса, заготовленная в более поздние сроки, обычно характеризуется пониженным выходом лимонной кислоты. Заготавливают мелассу исходя из 15-месячного запаса.

Меласса считается пригодной для производства лимонной кислоты, если в оптимальных условиях подготовки и ферментации в поверхностных условиях (в стаканах с площадью дна 0,42 $дм^2$, концентрации сахара 15 %, высоте слоя 9 см, продолжительности ферментации 7 сут и соответствующем штамме — поверхностном или глубинном) будет получен съем: на мелассе для глубинной ферментации не менее 1800 г/($м^2$·сут), для подливов — не менее 1500; на мелассе для поверхностной ферментации — не менее 1400 г/($м^2$·сут).

Так как процесс биохимической оценки качества меласс очень длителен, то для поверхностного способа производства лимонной кислоты предложены ускоренные методы: по накоплению инвертного сахара в среде на вторые сутки ферментации и по величине

съема на третьи сутки для штаммов Р-1 и Р-3. Математическая обработка экспериментальных данных по первому методу подтвердила линейную зависимость, подчиняющуюся уравнению [9]:

$$y = 57,6 + 15,2x,$$

где y — прогнозируемый съем лимонной кислоты, г/(м²·сут); x — концентрация инвертного сахара в мелассной среде через двое суток после начала ферментации, г/л.

При наличии на вторые сутки ферментации в культуральной жидкости не менее 90 г инвертного сахара в 1 л возможен съем, удовлетворяющий требованиям к мелассе.

Второй метод дал также хорошие результаты. Съем лимонной кислоты на седьмые y и на третьи сутки x ферментации выражается уравнением [53]:

$$y = 526 + 1,03x.$$

Достаточно высокий коэффициент корреляции (0,885) свидетельствует о тесной связи между y и x. Точность прогнозирования по первому и последнему методам ± 10 %.

ПРИЕМ И ХРАНЕНИЕ МЕЛАССЫ

Меласса поступает на завод в железнодорожных цистернах грузоподъемностью от 25 до 120 т и в автоцистернах. Все виды тары должны быть чистыми, без посторонних запахов и посторонних предметов. Железнодорожные и автоцистерны должны иметь нижние сливные устройства. Каждая цистерна сопровождается накладной и приложенным к ней сертификатом, в котором указываются масса мелассы и ее плотность.

Мелассу сливают из цистерн самотеком в расположенные ниже приемные сборники — стальные резервуары, объем которых рассчитан на суточную работу завода. В сборники меласса стекает по изготовленным из листовой стали желобам такой длины, чтобы одновременно можно было разгружать от 3 до 5 железнодорожных цистерн. Из приемных сборников мелассу коловратным насосом перекачивают в резервуары для хранения. В холодное время мелассу при выгрузке подогревают глухим паром. Смывки мелассы от пропарки цистерн и бочек при их разгрузке собирают отдельно и немедленно направляют на переработку.

В 1982 г. Минпищепром СССР утвердил ОСТ 18—395—82 «Меласса свекловичная». Согласно ОСТ меласса по физико-химическим показателям должна соответствовать следующим требованиям (%): массовая доля не менее сухих веществ 75, сахарозы 43, суммы сбраживаемых веществ 44 и pH среды от 6,5 до 8,5. Окончательное заключение о пригодности мелассы для отгрузки заводам лимонной кислоты может быть сделано только на основании биохимических испытаний, выполняемых заводом-потребителем. При транспортировании и сливе мелассы потери ее не должны превышать (в % к массе мелассы): при перевозке в железнодо-

рожных цистернах 0,72; при перевозке в автоцистернах в зимний период — 0,05, в летний — 0,11.

Меласса на сахарных и лимоннокислотных заводах должна храниться в наземных стальных резервуарах (баках) вместимостью 1000—3000 т, покрытых исправной конусовидной крышей с барьером.

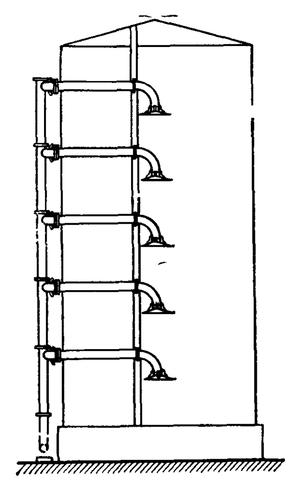


Рис. 13. Схема усреднения состава мелассы в в резервуаре для хранения.

Каждый резервуар должен быть оборудован наружной стационарной лестницей; пробными кранами диаметром 25 мм, установленными по высоте на расстоянии 1 м один от другого вблизи наружной лестницы; поплавковым уровнемером, связанным со шкалой на внешней стороне стенки резервуара для контроля за его наполнением; наполняющей трубой, верхний конец которой внутри резервуара загнут к стенке (во избежание пенообразования), с подводкой воды и пара для промывки и пропарки; воздушником в самой верхней точке резервуара, в нижней — расходным штуцером с задвижкой, к которому присоединена труба для перекачивания мелассы в производство; змеевиком около расходного штуцера для подогрева мелассы зимой ретурным паром до температуры не выше 30 °С. Для контроля температуры устанавливают дистанционные термометры. Все резервуары соединяют между собой коммуникацией, позволяющей направлять в производство мелассу из разных резервуаров или одновременно из всех, а также перекачивать из одного резервуара в другой или тот же самый (с целью усреднения состава), проводить зачистку и другие операции.

После каждого опорожнения резервуаров как сами резервуары, так и вспомогательные емкости, трубопроводы, арматуру и насосы чистят, промывают и стерилизуют. При этом внутреннюю поверхность резервуара сначала очищают скребками от присохшей мелассы и ржавчины, тщательно промывают водой из брандспойта, обрабатывают известью и вновь моют. Мелассопроводы промывают прокачиванием через них горячей воды и затем пропаривают. Содержащие сахар смывки, полученные при зачистке резервуаров, немедленно пускают в переработку.

Разную по качеству мелассу складируют и хранят по возможности отдельно. Усреднение мелассы проводят непосредственно перед подачей в производство, поскольку при хранении она расслаивается. Хорошее усреднение мелассы достигается перекачиванием ее с помощью устройства, изображенного на рис. 13.

По нормам Минпищепрома СССР потери мелассы при хранении не должны превышать 0,15 % к массе.

ТЕОРИЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ МЕЛАССНЫХ СРЕД

Ферментация мелассного раствора после разбавления без обработки его дает низкий выход лимонной кислоты, так как содержащиеся в нем ионы тяжелых металлов способствуют росту мицелия в ущерб кислотообразованию. С самого начала развития промышленности большое внимание уделяли подготовке мелассы для ферментации, освобождая ее в основном от избытка железа до величины, необходимой для поддержания основных биологических функций гриба. В настоящее время для этой цели применяют гексацианоферроат калия и другие комплексообразователи.

Обработка мелассных растворов гексацианоферроатом и другими комплексообразователями

Гексацианоферроат калия $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ — светло-желтые пластинчатые октаэдрические кристаллы плотностью 1,85 г/см³. Он устойчив на воздухе. При нагревании до 70 °С теряет кристаллизационную воду и белеет. При сильном накаливании разлагается на KCN и Fe_3C с выделением азота. Он имеет довольно сложное строение:

```
K——C——N               N═══C——K
  //     \\          /      \
 N         C—Fe—C          N   .
  \      /         \\      //
K——C═══N             N——C——K
```

В водном растворе соль диссоциирует:

$$K_4[Fe(CN)]_6 \rightleftharpoons 4K^+ + [Fe(CN)_6]^{4-}.$$

Комплексный ион этого соединения весьма прочен (константа нестойкости $K = 10^{-35}$), поэтому гексацианоферроат калия не дает ни реакции ионов Fe^{2+}, ни реакций цианид-ионов и не токсичен.

Гексацианоферроат калия хорошо растворяется в воде (22,4 %, 20 °С). В водных растворах имеет место частичный гидролиз

$$[Fe(CN)_6]^{4-} + H_2O \rightleftharpoons H[Fe(CN)_6]^{3-} + OH^-.$$

Равновесие несколько смещено вправо, вследствие чего в растворах гексацианоферроатов щелочных металлов всегда содержится некоторое количество ионов OH^-. При связывании $H[Fe(CN)_6]^{3-}$ в нерастворимое соединение происходит резкое смещение равновесия вправо, чем объясняется подщелачивание мелассных растворов после варки.

Растворы гексацианоферроата при длительном хранении разлагаются:

$$[Fe(CN)_6]^{4-} + H_2O \rightleftharpoons [Fe(CN)_5OH_2]^{3-} + CN^-.$$

При кипячении растворов разложение ускоряется за счет частичного удаления HCN с паром:

$$[Fe(CN)_5OH_2]^{3-} + CN^- \rightleftharpoons [Fe(CN)_5OH]^{4-} + HCN.$$

Таким образом, наряду с преобладающими ионами $[Fe(CN)_6]$ всегда в очень небольшом количестве содержатся ионы $[Fe(CN)_5OH_2]$, $H[Fe(CN)_6]$, $[Fe(CN)_5OH]$, OH и CN.

В кислой среде, особенно при нагревании, гексацианоферроат разлагается по реакции

$$[Fe(CN)_6]^{4-} + H^+ + H_2O \rightleftharpoons [Fe(CN)_5OH_2]^{3-} + HCN.$$

В присутствии кислорода в нейтральной и щелочных средах осаждается $Fe(OH)_3$

$$4[Fe(CN)_6]^{4-} + O_2 + 10H_2O \rightarrow 4Fe(OH)_3 + 8HCN + 16CN^-.$$

В кислой среде в присутствии кислорода разложение протекает по реакции

$$8[Fe(CN)_6]^{4-} + 28HCl + O_2 \rightarrow 28Cl^- + 24HCN + 4Fe[Fe(CN)_6] + 2H_2O.$$

При обычной (комнатной) температуре скорость этих реакций мала, при кипячении мелассных растворов сильно увеличивается.

Растворы солей Fe^{3+} с гексацианоферроатом калия образуют темно-синий осадок (берлинская лазурь):

$$4FeCl_3 + 3K_4[Fe(CN)_6] \rightarrow Fe_4[Fe(CN)_6]_3 + 12KCl.$$

С белком в слабокислой среде образуются нерастворимые соединения

$$4R{-}\underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{CH}}{-}NH_3^+ + [Fe(CN)_6]^{4-} \rightarrow \left(R{-}\underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{CH}}{-}NH_3\right)_4 \cdot [Fe(CN)_6].$$

При подготовке мелассной среды вместо гексацианоферроата калия нельзя применять $Ca(NH_4)_2 \cdot Fe(CN)_6$ и тем более гексацианоферроат кальция, так как при этом выход лимонной кислоты уменьшается примерно на 15 %, что может быть поставлено в связь с отрицательным влиянием кальция [69].

Г. Леопольд с сотр. обнаружили в осадке ионы Fe, Al, Ca, Mg и K. По цвету осадка можно было предположить, что в мелассе содержится в основном Fe^{2+}, который, окисляясь на воздухе, переходит в Fe^{3+}. При этом осадок синеет, превращаясь в берлинскую лазурь [106]. Из 21 элемента, идентифицированного в мелассе, 18 в большей или меньшей степени осаждаются (Fe, Zr, Ti, Cr, Ag, Al, Co, Ni, Pb, V, Na, K, Cu, Mg, Mn, Zn, Si, Ca). Только содержание бария, бериллия и молибдена остается неизменным. Таким образом, гексационоферроат действует на минеральные вещества мелассы не селективно и наряду с железом, марганцем, а, возможно, и с другими нежелательными элементами, осаждает и элементы, благоприятно влияющие на рост мицелия и образование лимонной кислоты A. niger. На основании этого был предложен метод, по которому осадки на кюветах от хорошо ферментируемых мелассных сред отделяют и добавляют к средам от плохо ферментируемых меласс.

При обработке мелассы оптимальными дозами гексацианоферроата калия (от 200 до 900 мг/300 г мелассы) от 80 до 90 % его расходуется на осаждение компонентов мелассы, 7—14 % находится в растворе в связанном состоянии и 7—10 % в свободном. Свободный гексацианоферроат появляется при определенных для каждой мелассы его дозировках. При этом концентрация свободного гексацианоферроата не превышает 40—50 мг/л. При большом избытке свободного гексацианоферроата происходит угнетение роста мицелия, снижение кислотообразования и повышение содержания глюконовой кислоты в общем составе кислот. Однако свободный гексацианоферроат не оказывает прямого влияния ни на рост, ни на кислотообразование, и содержание его связано со

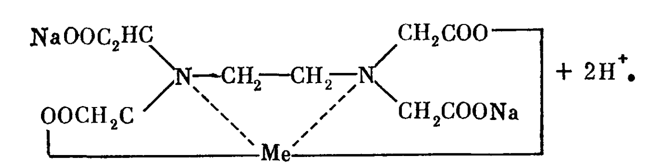
степенью обеднения мелассы микроэлементами, в частности, ионами цинка [69, 106].

При обработке гексацианоферроатом удаляется около 95 % марганца, но 50—80 частей на биллион частей остается свободным.

Содержание свободного гексацианоферроата контролируют по индикаторной бумажке: фильтровальная бумага равномерно пропитывается 10%-ным раствором хлорного железа, подкисленного соляной кислотой (2,5 мл 1 н. раствора HCl на 100 мл раствора хлорного железа) и высушенной при 80 °С. Желтая индикаторная бумажка, опущенная в раствор, в присутствии свободного гексацианоферроата посинеет. Пользуются и химико-физическим методом, основанным на той же реакции, но с определением оптической плотности (при $\lambda=700$ нм). Контролем служит стандартная кривая.

Варку можно проводить со всем количеством гексацианоферроата, с $^2/_3$ его и добавлением $^1/_3$ после варки; можно все количество его вводить до подачи мелассного раствора («обратная» варка) [106].

Наряду с гексацианоферроатом калия применяют и другие соли, например, гексацианоферроат калия (красную кровяную соль). Двунатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА, комплексон Ш, трилон Б), образует с ионами тяжелых металлов очень прочные нерастворимые внутрикомплексные соли, при этом металл замещает атомы водорода в карбоксильных группах и связывается координационной связью с атомами азота:



С Ca- и Mg-ионами он образует растворимые соли. С поливалентными ионами металлов трилон Б реагирует при $pH<1$, с ионами трехвалентных металлов — при pH 3—5 и с одно- и двухвалентными — при pH 7. Константа нестойкости $[Fe\ ЭДТА]^- \rightleftarrows Fe^{3+} + ЭДТА$ $K=7{,}94\cdot10^{-26}$, или $pK=-\lg K=25{,}16$.

При обработке мелассных растворов трилоном Б заменяют от 20 до 40 % гексацианоферроата калия. Трилон добавляют при температуре 60 °С не раньше чем через 30 мин после гексацианоферроата калия. Применение трилона повышает выход лимонной кислоты примерно на 15 %. При внесении в среду трилона Б pH ее понижается на 0,2—0,3 ед., что необходимо учитывать.

Можно применять и другие комплексообразователи: 8-оксихинолин, 2,4-динитрофенол, роданид калия, полифосфаты натрия и другие.

Механическая и ионообменная очистка сред и действие различных добавок

Механическая очистка мелассных растворов путем осветления на кларификаторах отрицательно отражается на кислотообразовании A. niger [17]. Обработка активным углем с отделением его ухудшает качество среды, ферментация в присутствии угля повышает выход лимонной кислоты.

Способ ионного обмена появился в США в 1949 г. на предприятиях фирмы Miles Laboratories, Inc. Лучшие результаты по кислотообразованию дало катионирование при снижении золы до 4 % по массе мелассы. Катионированный раствор имеет pH 1,4—1,6 и содержит железа 1—2 части на 1 миллион. Его нейтрализуют аммиаком (pH~3) и добавляют питательные соли. Содержание цинка должно быть 10—30 частей на каждую часть железа. При очистке ионообменом качество исходной мелассы почти не отражается на кислотообразующей способности A. niger.

В настоящее время за рубежом при приготовлении питательных сред катионообмену подвергают только растворы сахаров — сахарозы, глюкозы, ферментированных гидролизатов крахмала.

С целью регулирования роста мицелия и стимулирования кислотообразования испытано действие различных добавок. Гиббереллин A не оказывал никакого влияния на оба процесса. Пшеничные и ржаные отруби и экстракты из них увеличивали лишь биомассу гриба. Выход лимонной кислоты возрастал от добавления спиртов [98] и автолизата самого мицелия A niger.

Интерес представляет применение ПАВ и сланцевых кислот. ПАВ могут оказывать различное действие: понижать поверхностное натяжение раствора; адсорбируясь на поверхности конидий и мицелия, изменять проницаемость клеточных мембран, нарушать координацию систем эндоферментов. Они могут служить дополнительными компонентами конструктивного обмена гриба, средством улучшения субстратно-ферментных контактов, быть солюбилизаторами нерастворимых в воде питательных веществ, регуляторами величины pH и проч. Комплексное воздействие этих механизмов может приводить к угнетению жизнедеятельности культуры или к стимулированию обменных процессов и биосинтеза целевого продукта. Сульфонаты жирных кислот, диизопропилсульфонат и полиэтиленгликолмонолаурат оказали положительное влияние на кислотообразование A. niger при поверхностном способе ферментации.

Сланцевые кислоты повышают выход лимонной кислоты, но механизм их действия недостаточно ясен. Добавление токсических веществ 3-гидроксил-2-нафтойной кислоты, 4-метилубеллферона, 1- и 2-нафтола и 2,6-ксиленола в концентрациях, близких к летальным, влияет на дыхательные ферменты, изменяя метаболизм в сторону повышения выхода лимонной кислоты (добавляют в среду через 50 ч после посева конидий, когда окончательно сформируется кислотообразующий мицелий). Выход лимонной кислоты увеличивается при добавлении в среду аммонийных солей в течение вторых-третьих суток ферментации.

Добавление в среду небольшого количества кислот цикла Кребса переводит этот цикл в новое стационарное состояние, способствующее его интенсификации. Эти кислоты могут быть использованы для образования и других активных соединений, участвующих в метаболизме.

Стерилизация мелассных сред

При возникновении производства лимонной кислоты предполагали, что благодаря сильному подкислению среды во время ферментации не следует бояться инфекции. Однако вскоре выяснилось, что это не так и обсеменение посторонними микроорганизмами наносит вред производству.

Наиболее надежным и экономичным способом стерилизации является тепловая — насыщенным водяным паром. Температура

должна быть выше летальной для наиболее стойких споровых форм. При преобладании спороносящих бактерий выдерживают температуру 125—130 °С и экспозицию не меньше 30 мин. Нужно добиваться уничтожения всех микроорганизмов (стерильности) среды, но так как в производстве это очень трудно, то для оставшегося пренебрежимо малого (технически допустимого) количества микрофлоры, а также для посторонних микроорганизмов, случайно попавших со сжатым воздухом и другими путями, создают неблагоприятные для развития условия добавлением в среду антимикробных веществ, т. е. проводят защищенную ферментацию.

Формалина, обычно применяемого с этой целью при поверхностной ферментации, достаточно 0,006—0,01 % к массе мелассы, бо́льшая доза отрицательно действует на кислотообразующую способность A. niger. Эффективен фурациллин в концентрации 10—15 мг/л (добавляют при температуре 50 °С), 5-нитрофурилроданид и другие производные фурана.

Испытаны также муравьиная кислота, кремнефтористый натрий, пентахлорфенолят натрия, но они одновременно снижают выход лимонной кислоты. Сульфамидные препараты не подавляют бактерий. Бактерицидные концентрации антибиотиков (млн. ед./м^3): стрептомицин 40, биомицин 4, тетрамицин 2, полимиксин 1 [33]. Известны рекомендации по применению неомицина, низина, левомицетина, полимиксина, а при вспышке дрожжевой инфекции — леворина. Однако, обладая эффективным антимикробным действием и отсутствием отрицательного влияния на A. niger, антибиотики имеют тот недостаток, что они очень дороги.

Тепловая стерилизация мелассных сред при указанной выше температуре снижает качество их для биохимической переработки. С целью «смягчения» теплового режима целесообразно тепловую обработку проводить в присутствии антимикробных веществ. Снижение температуры без существенного изменения состава питательной среды может быть достигнуто также предварительной обработкой ферментным препаратом, расщепляющим стенки бактерий и спор. Во всех случаях, когда требуется сохранить термолабильные компоненты среды, стерилизацию ведут при более высокой температуре и соответственно меньшем времени, так как с повышением температуры скорость гибели микроорганизмов возрастает быстрее скорости разрушения этих компонентов.

Предложено применение и других методов стерилизации мелассы: различными видами лучистой энергии (УФ-лучи, γ-лучи, лазерное излучение), ультразвуком, импульсными электрическими разрядами, наложением электромагнитных полей сверхвысокой частоты, фильтрацией через антимикробные волокна и т. д. но они пока не нашли применения в производстве.

ПРАКТИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ МЕЛАССНЫХ СРЕД

В задачу подготовительного отделения входит взвешивание поступающей мелассы и приготовление из нее питательной среды.

Оптимальное количество добавляемых гексацианоферроата калия и питательных солей предварительно определяется лабораторией завода на основании биохимического испытания мелассы методом нахождения частных оптимумов на фоне других. Более рационально это делать методом математического планирования полного многофакторного эксперимента Бокса — Уилсона с последующим восхождением к оптимуму по градиенту. По сравнению с применяемым в производстве данный метод вдвое сокращает число вариантов эксперимента, а продолжительность их — с 45 сут до 18. При этом результаты более надежны и позволяют штамму гриба более полно проявить свои потенциальные возможности по кислотообразованию [16].

Растворы готовят различной концентрации и расход мелассы (в кг) на одну варку определяют по формуле

$$G = \frac{VC}{S} \cdot 100,$$

где V — объем готового раствора, л; C — концентрация готового раствора (по сахару), кг/л; S — содержание сахара в мелассе, %.

Вода употребляется мягкая, питьевого достоинства. Соли жесткости при ферментации реагируют с образующимися кислотами, задерживая снижение pH, и чем вода жестче, тем больше эта задержка. Вместо свежей воды можно использовать от 30 до 100 % слабоконцентрированной промывной воды от промывки цитрата кальция с содержанием 0,5—3,5 % сухих веществ.

Приготовление мелассных сред для поверхностной ферментации

Рассчитанное количество мелассы отвешивают в сборнике, установленном на весах, и передают в варочный котел, содержащий нагретую до кипения воду в количестве, необходимом для разбавления мелассы (1 : 1). Мелассу загружают в варочный котел при работающей мешалке и барботировании паром. Затем из мерников подают серную кислоту или раствор кальцинированной соды для доведения pH до 6,8—7,2.

Раствор кипятят 15—30 мин (в зависимости от степени и характера обсемененности мелассы микроорганизмами), добавляют заданное количество гексацианоферроата калия, кипятят около 10 мин и добавляют заданное количество трилона Б (в небольшом количестве воды). Кипячение продолжают еще 10—20 мин, после чего раствор проверяют на присутствие свободного гексацианоферроата с помощью специальной индикаторной бумажки. При отрицательной реакции добавляют ориентировочно 10 % (от нормы) гексацианоферроата калия, кипятят 5 мин и вновь контролируют. Гексацианоферроат добавляют до получения положительной реакции.

Кроме того, проверяют величину pH. В случае отклонения добавляют кислоту или щелочь до pH 6,8—7,2. После этого в

мелассный раствор добавляют стерильную холодную воду до 90 % объема готового раствора. При работающей мешалке в охлажденный до 60—70 °С раствор вносят стерильные растворы KH_2PO_4 (при необходимости) и $ZnSO_4$, а также растворы противомикробных средств.

При использовании некоторых меласс вводят микроэлементы — медь ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) и кобальт [$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$]. В заключение мелассную среду доводят стерильной холодной водой до необходимого объема и перемешивают. Готовую среду температурой 45—50 °С при непрерывном перемешивании перекачивают в ферментационные камеры. В случае появления инфекции в камерах мелассную среду передают при температуре 70 °С.

Мелассную среду готовят концентрацией 12—16 % (по сахару). Если не хватает хорошо ферментируемой мелассы, в нее добавляют плохо ферментируемую. Смесь дает больший выход лимонной кислоты, чем выход, пропорциональный содержанию каждой из меласс в питательной среде.

Приготовление мелассных сред для глубинной ферментации

При работе принятым на отечественных заводах глубинным способом ферментации готовят мелассные среды двух концентраций (по сахару): 3%-ной — для получения посевного мицелия и первоначальной ферментации и 20—25%-ную для подливов в процессе ферментации.

Мелассная среда для посевного мицелия. В варочном аппарате при работающей мешалке растворяют от-

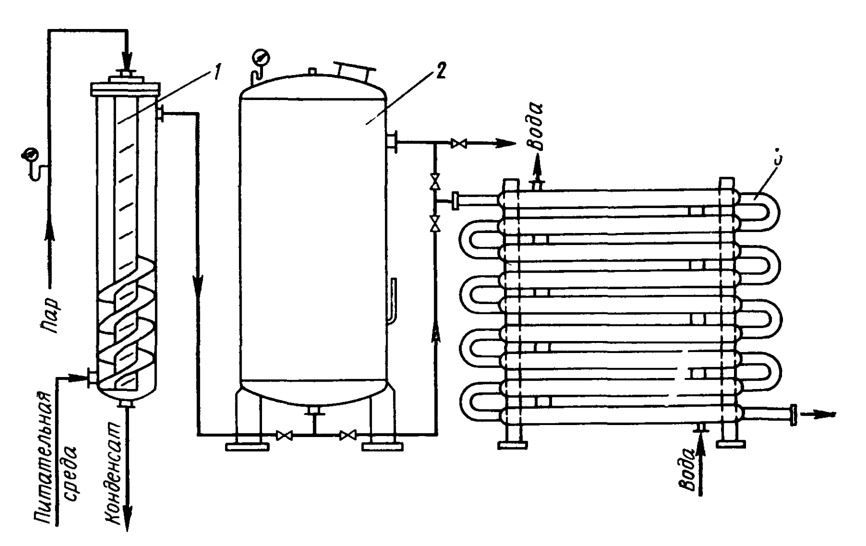


Рис. 14 Стерилизационная установка (схема)·
1 — стерилизационная колонка; 2 — выдерживатель; 3 — холодильник.

вешенное количество мелассы в кипящей воде (соотношение 1 : 1). При содержании в мелассе кальция более 0,4 % CaO избыток его осаждают ЩКА, кипятят 5—10 мин, добавляют серную кислоту или кальцинированную соду, необходимые для установления pH в пределах 6,8—7,2. Затем прибавляют раствор гексацианоферроата, снова кипятят 5—10 мин, проверяют на содержание свободного гексацианоферроата и проводят корректировку. О добавлении трилона Б — см. с. 112. Проверяют и корректируют pH среды.

Далее вводят растворы хлорида аммония и сульфата магния, доводят водой до объема среды, соответствующего 3%-ной концентрации, нагревают до кипения и насосом перекачивают на стерилизационную установку непрерывного действия.

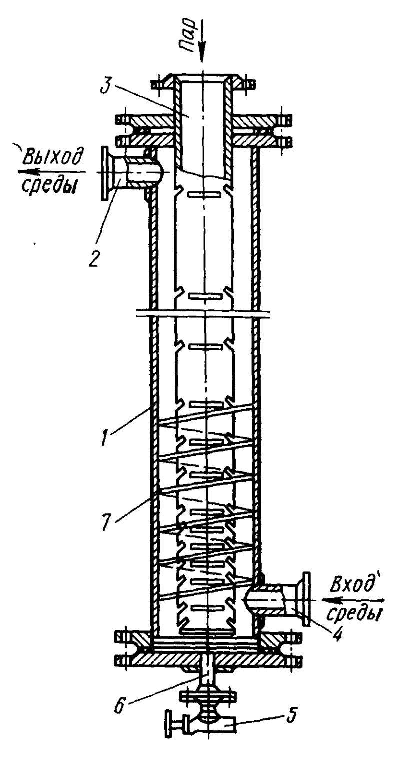


Рис. 15. Стерилизационная колонка:

1 — корпус; 2 — штуцер для выхода среды; 3 — внутренняя труба; 4 — штуцер для ввода среды; 5 — вентиль; 6 — штуцер для нижнего спуска; 7 — шнек.

Стерилизационная установка (рис. 14) состоит из стерилизационной колонки, выдерживателя и холодильника типа «труба в трубе». Стерилизационная колонка (рис. 15) имеет две трубы — наружную и внутреннюю. Пар подается по внутренней трубе со щелевидными прорезями, через которые он поступает в питательную среду. Среда подается снизу, движение ее происходит по спирали благодаря наличию винтовых направляющих.

Стерилизацию ведут при температуре 122—124 °С; стерилизуемая среда поступает в выдерживатель на 10—15 мин, а затем, минуя холодильник, поступает в посевной ферментатор. Приготовление среды завершается в посевном ферментаторе. В нее при работающей мешалке и температуре 70—80 °С вводят из инокулятора через посевной штуцер антимикробный раствор, охлаждают через рубашку ферментатора водой до 35—36 °С и затем вводят стерильные растворы KH_2PO_4 и $ZnSO_4$. Контролируют pH готового раствора (6,8—7,2) и в необходимых случаях корректируют его добавлением серной кислоты или стерильного раствора соды.

При стерилизации мелассных сред часть гексацианоферроата калия разрушается. Кроме того, происходит повышение pH. Это и понятно, так как при

взаимодействии гексацианоферроата калия с солями тяжелых металлов образуются нерастворимые в воде комплексы с освобождением ионов калия, подщелачивающих среду:

$$K_4[Fe(CN)_6] + 2Me^{2+} \rightarrow Me_2[Fe(CN)_6] + 4K^+;$$

$$[Fe(CN)_6]^{4-} + H_2O \rightleftharpoons H[Fe(CN)_6]^{3-} + OH^-;$$

$$K^+ + OH^- \rightleftharpoons KOH.$$

Обработка мелассных растворов при температуре выше 120 °С в течение 20 мин и более приводит к изменению pH. Среды, приготовленные из кислых мелacc, при любом исходном значении pH еще больше подкисляются, а растворы, приготовленные из щелочных мелacc, еще больше подщелачиваются. Это является следствием сложных процессов, происходящих в мелассных растворах. С повышением температуры усиливаются диссоциация и гидролиз солей. Поскольку константа гидролиза солей зависит и от изменения ионного произведения воды и от изменения константы диссоциации кислот, то конечная величина pH мелассной среды является функцией соотношения этих констант.

Мелассная среда для ферментации. Приготовление этой среды завершается в основном ферментаторе и складывается из следующих последовательных операций.

В варочном аппарате кипятят водопроводную воду (25—30 % от объема ферментатора) и направляют ее в стерилизационную установку, где стерилизуют при температуре 128—130 °С и после охлаждения переводят в ферментатор. Растворы питательных солей (KH_2PO_4, NH_4Cl, $MgSO_4$, $ZnSO_4$) в горячей воде приготавливают в том же аппарате и после пропускания их через стерилизационную установку направляют в ферментатор.

Затем в варочном аппарате готовят мелассный раствор. Мелассу разбавляют водой в соотношении 1 : 1 и обрабатывают горячий раствор ЩКА, как обычно. Раствор кипятят 5—10 мин, доводят pH до 6,8—7,2, кипятят 10—20 мин и обрабатывают раствором гексацианоферроата калия, после чего кипятят еще 5—10 мин и проверяют на содержание свободного гексацианоферроата. Проверяют и корректируют pH в пределах 6,8—7,2. Мелассная среда, пройдя стерилизационную установку, поступает в ферментатор. Здесь среду разбавляют стерильной водой до объема 60 м³ (в ферментаторе геометрическим объемом 100 м³) с учетом внесения посевного мицелия. Концентрация сахара в среде должна быть около 3 %, температура 32—34 °С.

Подливная мелассная среда. В варочном аппарате готовят раствор мелассы 20—25%-ной концентрацией сахара, кипятят 10 мин, доводят pH до 6,8—7,2 и снова кипятят 10 мин. Затем обрабатывают гексацианоферроатом калия, кипятят 10 мин и определяют свободный гексацианоферроат и pH Раствор стерилизуют, охлаждают до 34—36 °С и без добавления питательных солей направляют в емкость для подливного раствора, откуда его добавляют в ферментатор по мере необходимости.

Для приготовления этой среды можно использовать худшую по качеству мелассу, но среда, идущая на получение посевного мицелия и для начальной ферментации, должна быть из самой лучшей мелассы.

Глава 7. ПОЛУЧЕНИЕ ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА И ФЕРМЕНТАЦИЯ

ТЕХНОЛОГИЯ ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА

Задачей цеха получения посевного материала является обеспечение ферментационного цеха конидиями производственного штамма A. niger. Посевной материал должен отвечать следующим техническим требованиям: иметь высокую всхожесть конидий, быть морфологически однородным, обеспечивать высокие выход и съем продукта, не содержать посторонней микрофлоры.

Получение посевного материала складывается из следующих работ: 1) подготовка помещений, посуды и питательных сред; 2) сохранение производственных штаммов; 3) получение посевного материала; 4) хранение посевного материала.

Подготовка помещения, посуды и питательных сред

Цех (участок) получения конидий размещают в специальном здании или на верхних этажах других помещений, удаленных от ферментационного и химического цехов. Помещение должно быть чистым, сухим, хорошо проветриваемым. Желательно, чтобы помещение имело несколько блоков: 1) кладовая, моечная, автоклавная и препараторская; 2) посевная с тамбуром, термостатная с тамбуром и комната для сушки посевного материала; 3) смотровая с тамбуром, комнаты для сбора конидий, для фасовки и хранения посевного материала.

Помещения для разных штаммов (поверхностного и глубинного) должны быть отдельными, за исключением первого блока. Перед проведением микробиологических работ посевные комнаты и боксы стерилизуют при помощи бактерицидных ламп ДБ-15, ДБ-30, ПРК-4М, ПРК-7М и других в течение 3—6 ч. В случае необходимости боксы и посевные комнаты за 16—18 ч до начала микробиологических работ стерилизуют раствором 40%-ного формалина (5 г формалина на 1 м^3 помещения выпаривают на электрической плитке). Через 14—15 ч проводят дегазацию 25%-ным раствором аммиака (из расчета 3 г аммиака на 1 м^3 помещения) и воздух очищают стерильной водой из пульверизатора.

Работники входят в стерильных халатах, косынках и чистой обуви. Все необходимые для работы предметы вносят после обтирания их поверхности спиртом.

Всю посуду чисто моют горячей водой, высушивают и стерилизуют. Перед стерилизацией пробирки закрывают ватными пробками, колбы — ватными пробками и колпачками из пергаментной бумаги, чашки Петри и пипетки (с ватными тампонами в тупом конце) обертывают пергаментной бумагой, алюминиевые кюветы плотно закрывают ватно-марлевыми фильтрами и обертывают

пергаментной бумагой. Стерилизуют в автоклаве под избыточным паровым давлением 200 кПа (132 °С) в течение 30 мин или в сушильном шкафу при 160—180 °С в течение 3—1 ч. Спецодежду, завернутую в бумагу, стерилизуют также в автоклаве.

Для получения посевного материала используют алюминиевые кюветы — круглые с площадью дна 10—12 дм², высотой борта около 0,12 м и отогнутым наружу краем, и прямоугольные 0,48×0,24 м с высотой борта 0,12 м. Для уменьшения коррозии внутреннюю поверхность кювет покрывают бакелитовым или пищевым лаком марки ПЛ-561 или ФЛ-564.

Питательные среды готовят на основе пивного сусла. Неохмеленное сусло концентрацией 15—18 % сухих веществ с целью длительного хранения стерилизуют при избыточном давлении 100 кПа в течение 30 мин. При отсутствии готового сусла его приготовляют сами: для этого в заторный аппарат наливают такое количество нагретой до 48 °С воды, чтобы после засыпания сухого дробленого солода соотношение воды и солода составило 4 : 1. Температуру смеси сначала повышают до 50 °С и выдерживают 30 мин, затем до 70 °С и выдерживают 1 ч. Когда иодная проба покажет полноту осахаривания крахмала, затор фильтруют и готовое сусло стерилизуют.

Используют следующие питательные среды: сусло-агар — сусло фильтруют через вату, разбавляют водопроводной водой до концентрации 5—8 % (по сахару) и уплотняют 2—3 % агара; среда Журавского — в сусло концентрацией 5—8 % добавляют 1—3 % $NaCl$ (NH_4NO_3 и NH_4Cl) и 2—3 % агара; видоизмененная среда Журавского — в сусло концентрацией 5—8 % добавляют 1 % $NaCl$, 0,1 % мочевины и 2—3 % агара; среда Полоцкой и Шушкевич — к нефильтрованному пивному затору (5—8 %-ному) добавляют 2 % $NaCl$ и 1 % агара. В случае образования светлых конидий на 1 л питательной среды добавляют 1 мл 0,01 %-ного раствора $CuSO_4 \cdot 7H_2O$.

Сохранение производственных штаммов

С целью поддержания живых культур производственных штаммов, сохранения их морфологических, биохимических признаков и создания резервного фонда штаммов периодически, 1—2 раза в год, из конидий основных производственных штаммов выделяют лучшие спонтанные варианты. Для этого отбирают пробы из сохраняемых конидий, суспендируют их в стерильной воде встряхиванием в течение 5 мин. Затем суспензию фильтруют через плотный ватный фильтр для удаления обрывков мицелия и комочков конидий. Отфильтрованную суспензию разбавляют стерильной водой и высевают на чашки Петри с 20 мл сусло-агара и выращивают колонии при температуре 31—32 °С.

Из 20 типичных для данного штамма колоний выделяют варианты и высевают на две питательные среды: на сусло-агар для хранения культур и на сусло-агар с $NaCl$ и другими солями для

изучения кислотообразования. В отсеянных на сусло-агар культурах через 10 сут выращивания отделяют конидии и хранят их в чистых пробирках или колбочках.

Параллельно с культурами, выросшими на сусло-агаре с солями, засевают мелассные среды для изучения кислотообразования. После первой проверки наиболее активные из этих культур пересевают на сусловые среды того же состава и в выросших культурах вновь определяют образование лимонной кислоты. После трех пересевов и соответственно трех проверок кислотообразующей активности отбирают наиболее активные культуры и проверяют их морфологическую однородность, высевая конидии в чашки Петри на сусло-агар. Из наиболее продуктивных и однородных культур создается резервный фонд штамма.

Резервный фонд можно сохранять в течение квартала (без пересева) с активированным углем, тальком или стерильной землей. Метод сохранения живых культур под слоем минерального масла и лиофилизации не обеспечивает полного сохранения необходимых признаков у мутанта A. niger.

Получение посевного материала

Размножение штамма Л-1. Штамм Л-1 размножают в посевной комнате на сусло-агаре или среде Полоцкой — Шушкевич без солей. На первой стадии размножения конидии из резервного фонда высевают на одну из сред в 5—10 кювет по 25 мг в каждую (с помощью ватного тампона или пульверизатора). Перед засевом кюветы со стерильной средой охлаждают 6—7 ч до застывания агара. Засеянные кюветы выдерживают в термостатной камере при 32 °С и относительной влажности воздуха 95 % в течение 7 сут, а затем 2 сут при комнатной температуре.

Выросшие культуры просматривают в смотровой комнате в настольном боксе и отбраковывают культуры с незаконченным плодоношением и другими дефектами, в том числе и инфицированные. Конидии собирают посредством вакуумного устройства на фильтр из шелковой ткани, рассыпают тонким слоем (5 мм) в стерилизованные сухие кюветы, закрывают ватно-марлевыми фильтрами и подсушивают в вентилируемом термостате при 32 °С одни сутки.

После тщательного микробиологического и биохимического контроля конидии используют во второй стадии размножения на тех же питательных средах, но засевают одновременно 50—100 кювет. Готовый посевной материал имеет влажность 40—45 %, его высушивают тонким слоем в кюветах воздухом температурой около 32 °С в течение 2 сут до остаточной влажности около 25 %.

Конидии штамма Р-1 и Р-3 размножают на среде Полоцкой — Шушкевич или среде Журавского. В остальном методика обычная. Конидии штаммов проращивают 8 сут при 32 °С и 2 сут при комнатной температуре. До сбора конидии подсушивают теплым воздухом (30 °С), затем их смешивают в бидоне-

смесителе со стерильным углем в соотношении 1 : 2. Бидон заполняют на $^1/_4$ и вращают с частотой 25—30 об/мин 50—70 ч.

Расход конидий в производстве: штамма Л-1 около 1 г/м³ мелассной среды в посевном ферментаторе; штаммов Р-1 или Р-3 — до 0,15—0,20 г/м² площади кювет ферментационных камер. В 1 г готового посевного материала без наполнителя содержится 23—25 млрд. конидий.

Хранение посевного материала

Готовый посевной материал фасуют в стерильные стеклянные колбы или банки по 0,5—1,0 л, заполняя их на $^2/_3$. Сосуды с посевным материалом закрывают ватными пробками или ватничками и пергаментной бумагой. Посевной материал сохраняют при постоянной комнатной температуре и относительной влажности воздуха не выше 70 %. Сосуды с посевным материалом защищают от прямых солнечных лучей.

Посевной материал должен удовлетворять требованиям, приведенным в табл. 23.

Получение посевного материала в промышленности централизовано. Глубинный посевной материал готовит Ленинградский завод лимонной кислоты, поверхностный — Рижский завод биохимических препаратов.

Таблица 23

Требования к посевному материалу

Показатели	Штамм	
	Л-1	Р-1
Съем лимонной кислоты с 1 м² в сутки на 17%-ной мелассной среде (по сахару) при первоначальной высоте слоя 12 см и продолжительности 8 сут, г, не менее[1]	1700	—
Съем лимонной кислоты с 1 м² в сутки на 15%-ной мелассной среде (по сахару) при высоте слоя 12 см и продолжительности 8 сут, г, не менее	—	1700
Присутствие посторонней микрофлоры	Не допускается	
Присутствие морфологически измененных форм штамма, %, не более	0,7	1,0
В том числе малоактивных форм, %, не более	0,2	0,2
Всхожесть конидий, %, не менее	85	90
Численность конидий в 1 г посевного материала, млрд., не менее	25	30

[1] Съем лимонной кислоты определяют пробной ферментацией мелассной среды (меласса среднего качества), подготовленной в оптимальных условиях Более объективную его оценку для штамма Л-1 проводят на специальной стандартной синтетической сахарной среде (съем должен быть в пределах 920—1000 г/м² в сут)

ГЛУБИННАЯ ФЕРМЕНТАЦИЯ

Попытки получения лимонной кислоты способом глубинной ферментации относятся к 1930 г. (Г. Амелунг в Германии). В 1938 г. Л. Перкин разработал промышленный способ

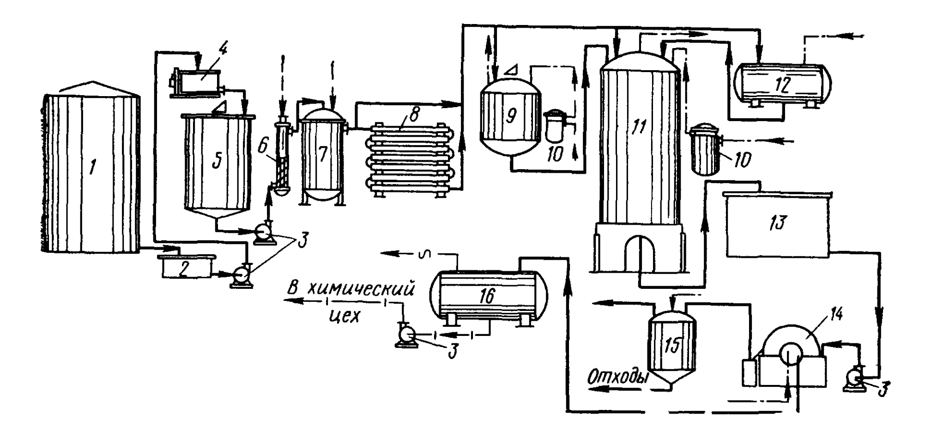


Рис. 16. Технологическая схема цеха глубинной ферментации:

1 — расходный бак для мелассы; *2* — промежуточный бак; *3* — насосы; *4* — весы; *5* — варочный аппарат; *6* — стерилизационная колонка; *7* — выдерживатель, *8* — холодильник; *9* — посевной ферментатор; *10* — фильтр; *11* — основной ферментатор, *12* — емкость для мелассной среды; *13* — сборник культуральной жидкости; *14* — барабанный вакуум-фильтр; *15* — сборник для мицелия; *16* — сборник для фильтрованной культуральной жидкости.

с использованием A. niger, а в 1950 г. фирма Майлз построила в США первый завод. В настоящее время в странах Запада около 80 % лимонной кислоты вырабатывается глубинной ферментацией.

На рис. 16 приведена технологическая схема глубинной ферментации, применяемая на заводах лимонной кислоты в СССР.

Ферментаторы

В отечественной промышленности подращивание мицелия и ферментацию проводят в отдельных аппаратах — ферментаторах. Посевной ферментатор имеет объем, равный 10 % от основного, и отличается от него лишь наличием мешалки для перемешивания. Основные ферментаторы объемом 50 м³ еще сохранились на старых заводах, на реконструированных и новых установлены ферментаторы объемом 100 м³. Создан ферментатор объемом 200 м³. На некоторых зарубежных заводах ферментаторы имеют объем 250—300 м³.

Способ перемешивания ферментируемой среды в основном ферментаторе — эрлифтный. Хотя при этом способе несколько ниже коэффициент массопередачи, считая по кислороду, и больше расход стерильного воздуха, но суммарный расход энергии на аэрацию и перемешивание меньше, чем при использовании мешалок. Кроме того, устраняется шум, а отсутствие вала мешалки с сальником в корпусе ферментатора создает большую гарантию от проникновения посторонней микрофлоры.

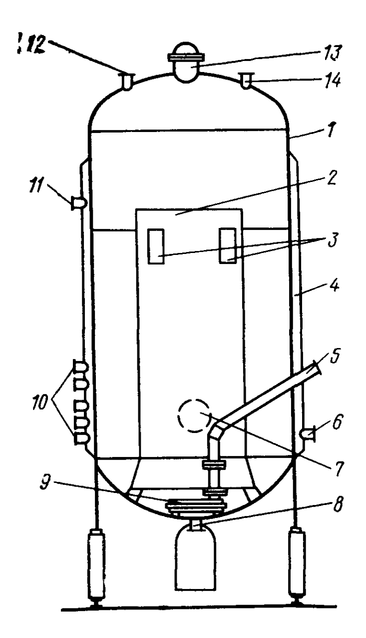


Рис. 17. Ферментатор объемом 100 м³.

Основной ферментатор (рис. 17) — сварной вертикальный цилиндрический сосуд *1* с эллиптическим днищем и крышкой, выполненный из листовой кислотоупорной стали 12Х18Н10Т толщиной 12—16 мм. Аппарат имеет внутренний диаметр 3,8 м, высоту цилиндрической части 8,6 м, геометрический объем 100 м³, рабочий объем 80—85 м³. Аппарат рассчитан на избыточное паровое давление при стерилизации до 0,3 МПа и гидравлическое давление 0,45 МПа. Снаружи изолирован.

В центре ферментатора расположена эрлифтная труба *2* диаметром 2,45 м, высотой 6,15 м с окнами *3* для циркуляции культуральной жидкости и распределительным устройством *9* для сжатого воздуха, который подается по наружной трубе *5*. В случае подачи сжатого воздуха не в эрлифтную трубу, а в кольцевое пространство между корпусом и эрлифтной трубой окна для циркуляции жидкости делают на уровне несколько ниже середины эрлифтной трубы.

Для снижения температуры в ферментаторе в цилиндрической части его предусмотрена рубашка *4*, по которой прокачивается охлаждающая вода (штуцер *6* служит для подачи воды, штуцер *11* — для ее удаления). В некоторых ферментаторах водяная рубашка находится на эрлифтной трубе. На боковой поверхности корпуса имеется нижний люк *7* для чистки и мойки внутренней части аппарата и пять штуцеров *10* (два — для установки пробоотборников, по одному — для установки датчиков уровня, дистанционного термометра и электродов для определения pH).

На крышке находятся: верхний люк *13*, штуцер *14* для отвода воздуха в ловушку, штуцер для подачи питательной среды и подросшего мицелия *12* и не показанные на рисунке штуцера для подливов, подвода пара для стерилизации и установки манометра. На крышке смонтированы смотровое окно с очисткой его и подсветкой, резервный штуцер. На днище имеется штуцер *8*, через который спускают культуральную жидкость. Оптимальное отношение высоты к диаметру в эрлифтных ферментаторах равно $H : D \geqslant 4—6$ при ограничении высоты аппарата 22—24 м.

Подготовка аппаратуры и коммуникаций к работе

По окончании каждого цикла в посевном и основном ферментаторах и удалении из них соответственно подросшего мицелия или культуральной жидкости ферментаторы открыва-

ют и моют горячей водой из брандспойта, очищая от остатков мицелия.

Барботер продувают воздухом. После осмотра, а при необходимости и ремонта ферментатор снова моют водой, закрывают люк и вместе с другой аппаратурой стерилизуют открытым насыщенным паром. Перед стерилизацией аппаратуру и коммуникации промывают водой температурой 100 °С из варочного аппарата.

Стерилизационную колонку, выдерживатель, холодильник, коммуникации от холодильника к ферментатору и линию транспортировки подросшего мицелия стерилизуют при избыточном давлении 0,15—0,18 МПа в течение 2 ч, пропуская пар в основной ферментатор. Стерилизация ферментатора продолжается 2—3 ч под избыточным давлением 0,12—0,15 МПа.

Одновременно стерилизуют фильтры тонкой очистки воздуха и воздушные коммуникации, отработавший пар направляют также в ферментатор. Стерилизуют фильтры 1 ч под избыточным давлением 0,12—0,15 МПа. После заполнения фильтра стерильным волокнистым фильтрующим материалом через его рубашку пропускают пар в течение 2—3 ч под избыточным давлением 0,1—0,2 МПа. В нормальных условиях фильтры перезаряжают не чаще одного раза в месяц (при намокании волокон — немедленно). В конце стерилизации пропаривают пробоотборники, продуктовый штуцер для засева, сливную линию от ферментатора к трапу в течение 30 мин.

Пар должен быть насыщенным сухим. Влажность пара понижает в нем скрытую теплоту парообразования, а следовательно, и эффективность действия на микроорганизмы. Нецелесообразно применять и перегретый пар, так как при температуре, одинаковой с насыщенным паром, при его охлаждении без конденсации выделяется намного меньше тепла. В присутствии воздуха температура пара ниже общего давления, поэтому воздух нужно полностью предварительно удалять. Обычно это достигается гравитационным способом — вытеснением паром, имеющим более высокую плотность, чем воздух. Удаление воздушных пробок позволяет прогреть все детали оборудования и устранить вместе с ними возможный источник инфекции.

Благодаря хорошей теплопроводности металла и обмыванию внутренней поверхности ферментатора конденсатом пара этим способом достигается надежная стерилизация. Однако перед стерилизацией из ферментатора необходимо удалить осадки и вымыть его, иначе в осадках может сохраниться посторонняя микрофлора и в дальнейшем явиться источником инфекции.

Продолжительность стерилизации, приведенная выше, дана без учета времени, затрачиваемого на удаление воздуха и прогрев ферментатора.

Следует уделять большее внимание трудностерилизуемым частям ферментатора: штуцерам, пробоотборникам, датчикам, в

трубопроводах — запорной арматуре, фланцам, фасонным деталям, тупиковым местам и открытым окончаниям труб.

Стерилизацию аппаратуры и коммуникаций можно проводить раствором активированной хлорной извести в сочетании с пропаркой.

Хлорная известь — белый порошок с резким запахом, обладающий сильными окислительными свойствами. Главной составной частью ее является гипохлорит — кальциевая соль хлорноватистой кислоты — $Ca(ClO)_2$, которая при взаимодействии с водой распадается по реакциям:

$$Ca(ClO)_2 + 2H_2O \rightarrow Ca(OH)_2 + 2HClO;$$

$$HClO \rightarrow HCl + O;$$

$$Ca(ClO)_2 + 4HCl \rightarrow CaCl_2 + 2Cl_2 + H_2O.$$

Губительное действие на микрофлору оказывают как хлор, так и кислород в момент его выделения. Добавление хлорида аммония в раствор хлорной извести значительно усиливает ее действие. Получается активированная хлорная известь, расход которой в 50 раз меньше, чем хлорной извести.

Согласно ГОСТ 1692—58 хлорная известь марок А и Б содержит активного хлора 35 % и марки В — 32 %.

Для дезинфекции обмытый основной ферментатор объемом 100 м³ заполняют холодной водой и при перемешивании воздухом добавляют 10—15 кг хлорной извести. Всыпают столько же хлорида аммония, доливают водой до полного объема и перемешивают 30 мин. После 1,5 ч выдержки раствор перекачивают в свободный, подлежащий стерилизации ферментатор или спускают в канализацию. При повторном использовании хлорной воды в нее вновь вносят в тех же количествах хлорную известь и хлорид аммония.

Одновременно обрабатывают стерилизационную установку и продуктовые коммуникации. Их заполняют 0,01—0,015 %-ным раствором активированной хлорной извести и выдерживают 2 ч, после чего хлорную воду удаляют. Затем стерилизационную установку, коммуникации к ферментатору и линию транспортировки подросшего мицелия пропаривают при избыточном давлении 0,15 МПа в течение 1,5 ч, пропуская пар в ферментатор. Стерилизацию продолжают 1,5 ч под избыточным давлением 0,12 МПа. Противомикробные фильтры и воздушные коммуникации стерилизуют паром, как указано выше.

По окончании пропарки в ферментатор через барботер подают стерильный воздух, поддерживая избыточное давление 0,02—0,03 МПа (во избежание попадания посторонней микрофлоры).

Работы по подготовке к внутреннему осмотру, чистке, мойке или ремонту ферментатора должны вестись под руководством старшего мастера или механика цеха. Сначала нужно убедиться в отсутствии диоксида углерода и в невозможности поступления в ферментатор пара. Работу в ферментаторе ведут с притоком в него воздуха. Рабочий должен надеть аварийный пояс с веревкой и противогаз. В течение всего времени работы в ферментаторе у его люка должен стоять наблюдатель, назначенный старшим мастером.

При появлении дрожжевой инфекции один раз в сутки все рабочее помещение обрабатывают 1 %-ным раствором хлорамина. Этим же раствором протирают снаружи аппаратуру и коммуникации; смачивают коврики при входе во все помещения.

Хлорамин Б — бензосульфохлорамид натрия — белый кристаллический порошок, хорошо растворимый в воде (1 : 20), содержащий 25—29 % активного хлора (ВТУ 27/24—79—65). Он бактери-

циден против вегетативных форм в концентрации 0,25—0,5 % и температуре 30 °С, спороциден — при 50—60 °С.

Кроме борьбы с посторонней микрофлорой, в ферментационном цехе проводят профилактические мероприятия. Периодически, не реже одного раза в неделю, полы, стены, а также поверхность аппаратов, сборников, трубопроводов моют 1—2%-ным раствором хлорной извести (рекомендуется менять антисептик).

Подращивание мицелия

Мелассную среду в основных ферментаторах засевают подросшим мицелием, полученным в посевных ферментаторах. За рубежом среду в основных ферментаторах засевают как подросшим мицелием, так и конидиями. Посев подросшим мицелием имеет то преимущество, что мицелий можно отбраковать еще до начала ферментации и более рационально использовать объем основных ферментаторов при небольшой начальной концентрации сахарсодержащих сред, принятой на наших заводах, уменьшить продолжительность основной ферментации. Пользуются молодым мицелием, находящимся в стадии активного роста; стареющий мицелий в основных ферментаторах долго не начинает размножаться.

Засев основных ферментаторов конидиями исключает дополнительную операцию — подращивание мицелия, оборудование для нее и еще один возможный источник инфекции ферментируемых сред при передаче подросшего мицелия в основной ферментатор. Подращивание мицелия за рубежом считается оправданным только на крупных заводах ввиду довольно высоких капитальных затрат и издержек на обслуживание и контроль работы этих ферментаторов.

Технологический режим подращивания мицелия: в посевной ферментатор к подготовленному раствору температурой 35—36 °С через инокулятор вводят суспензию конидий, которую готовят за 5—6 ч. Предварительно определенное количество сухих конидий замачивают в небольшом объеме мелассной среды и выдерживают при 32 °С в термостате. С целью активирования конидий (ускорения их прорастания и усиления кислотообразования) иногда добавляют препараты, содержащие набор микроэлементов, продукты метанового термофильного брожения, обрабатывают малыми дозами мутагенов или применяют другие способы.

После засева в ферментатор сразу подают стерильный воздух и включают в работу лопастную мешалку с частотой вращения 180 об/мин. Аэрацию и перемешивание раствора ведут в течение всего времени приготовления посевного мицелия при избыточном давлении 0,02—0,03 МПа. Температуру 34—35 °С поддерживают охлаждением водой через рубашку ферментатора. В посевном ферментаторе объемом 10 м^3 в первые шесть часов, когда конидии набухают и начинают прорастать, достаточно очень небольшого расхода воздуха 9—10 м^3/ч. В следующие 7—11 ч количе-

ство воздуха постепенно увеличивают до 18 м³/ч и через 12 ч до 36 м³/ч. В 10—12-часовом мицелии в центральных участках гиф появляются первые поперечные перегородки и начинается ветвление.

С этого времени происходит сильное вспенивание культуральной среды, поэтому в патрубок для посева вводят 25—30 мл стерилизованной технической олеиновой кислоты (группы А или Б по ГОСТ 10475—63), которая содержит не менее 92 % жирных кислот в безводном продукте, не более 0,25 % влаги и имеет температуру застывания 10—16 °С.

Кроме олеиновой кислоты можно пользоваться соапстоком — отходом щелочной рафинации растительного масла с содержанием от 30 до 60 % масла; кашалотовым жиром, состоящим из 56—70 % жирных кислот и 28—45 % неомыляемых веществ, температурой плавления 20—30 °С, отвердения 17—28 °С (ГОСТ 8714—58); гидрофузом — отходом при механической очистке растительных масел, содержащим клетчатки и других углеводов 7,3—8,6 %, растительного масла 44—72 %, фосфатидов 10—21 %, белков 4—18 % и минеральных веществ (золы) 2—4,7 %.

Можно применять несульфированные соединения — побочный продукт производства синтетических жирных кислот из жидких очищенных парафинов, представляющие собой смесь высших жирных спиртов и углеводородов частично непредельного ряда. По внешнему виду — это маслянистая жидкость темного цвета со слабым запахом нефтяных масел, температурой отвердения 16—18 °С. Пеногасящее действие их улучшается при смешивании с серной кислотой. Все пеногасители плохо растворимы в воде, поэтому их применяют в виде водной эмульсии (1:10), которую стерилизуют в автоклаве 30 мин при избыточном давлении 0,05 МПа.

Если через некоторое время культуральная жидкость начинает вновь пениться, вводят еще пеногаситель, так как при активном росте мицелия расход воздуха уменьшать нельзя. Пеногаситель добавляют в минимальном количестве, не влияющем на состояние культуры. При внесении больших количеств культура становится темной, ухудшаются условия роста гриба и последующего кислотообразования.

К 16—19 ч подают 45 м³ воздуха в 1 ч; к 20—24 ч, когда вырастает значительная масса мицелия, пенообразование обычно прекращается. Объем раствора заметно увеличивается за счет образовавшегося мицелия и мелких пузырьков воздуха, жидкость становится густой и светлой. С этого времени подают в ферментатор 70—72 м³ воздуха в 1 ч. После 24—30 ч количество подаваемого воздуха увеличивают до 90 м³/ч и до конца процесса поддерживают на уровне 90—100 м³/ч.

Готовая 28—36-часовая культура должна быть светлой, молочно-бежевой, насыщенной пузырьками воздуха со всплывающим мицелием. Мицелий — хлопьевидный, диффузный, содержащий немного мелких шарообразных комочков. Гифы — светлые, тонкие, вытянутые, активно ветвящиеся, со светлой прозрачной цитоплазмой, расположенной в пристенном слое; в центральной части клетки расположена большая вакуоль; общая (титруемая) кислотность — около 0,7—2,0 %.

Чаще пользуются 18—28-часовой культурой. Мицелий в такой культуре имеет гифы 2—4 мкм в поперечнике с 3—4 крупными

вакуолями. Гифы активно ветвятся, их кончики округлые. Культура темная, титруемая кислотность 0,15—0,25 %.

Процесс формирования мицелия и чистоту культуры контролируют микроскопированием проб. Присутствие посторонней микрофлоры недопустимо. Патологический мицелий образуется при нарушении технологического режима выращивания и при инфицировании посторонними микроорганизмами, что легче выявляется в 12-часовых пробах. Морфологические признаки, характерные для кислотообразующего гриба, формируются уже на ранней стадии его развития — при получении посевного мицелия и сохраняются в процессе ферментации.

Морфологические признаки хорошо образующего кислоту мицелия, описываемые зарубежными авторами, сильно отличаются от изложенных выше. По-видимому, это объясняется спецификой штаммов, условиями подращивания мицелия и ферментации.

Считается, что мицелий не пригоден для ферментации, если он представляет сплетение длинных тонких гиф, более или менее равномерно распределенных во всем объеме жидкости. Мицелий должен расти в основном в виде окатышей, которые представляют собой скопление гиф в форме клубка. Гифы в таких окатышах короткие, почкообразные, разветвленные и частично набухшие.

При хорошем состоянии посевного мицелия подращивание можно вести по отъемно-доливному способу. Он позволяет сократить расход посевного материала (конидий) в несколько раз, быстрее подрастить мицелий, уменьшить время и затраты на перезарядку посевных ферментаторов. Если произошла задержка в передаче культуры в основной ферментатор, то в посевном ферментаторе снижают температуру до 25 °С и содержимое ферментатора выдерживают до момента засева. Когда вследствие отбраковки подросшего мицелия его не оказывается ко времени засева основного ферментатора, разрешается передача молодой культуры из одного основного ферментатора в другой.

Основная ферментация

Этот способ предложен в сентябре 1956 г. Г. И. Журавским, О. Ф. Терентьевой, Е. Ф. Лясенковой, Э. С. Фишковой, И. В. Аглиш и др. В 1957 г. появился патент на аналогичный способ во Франции (авторы П. Верныо и Р. Нике из Usines de Melle), который одновременно был взят в США и ЧССР.

Сущность способа заключается в том, что с целью снижения буферности мелассной среды исходный раствор приготовляют примерно 3%-ной концентрации (по сахару), а затем, когда концентрация его начнет резко уменьшаться (вследствие ферментации), проводят подливы мелассной среды концентрацией 20—25 %. Обычно делают 3—4 подлива с таким расчетом, чтобы суммарная концентрация сахара составляла 12—13 %.

Заполнение ферментатора. Приготовление мелассной среды в ферментаторе проводят, как было указано (с. 118). При непре-

рывной подаче воздуха через стерилизационную установку последовательно вводят (при объеме ферментатора 100 м^3) 9 м^3 горячей воды температурой 126—129 °С, 9 м^3 воды температурой 32—34 °С, 6—10 м^3 стерильных растворов питательных солей температурой 32—34 °С, 6—10 м^3 горячей воды, 6—8 м^3 мелассного раствора и охлажденную воду в количестве, необходимом для доведения объема исходного мелассного раствора до 54 м^3.

Во время заполнения ферментатора содержимое его охлаждают водой до температуры 32—33 °С. Затем по пропаренной коммуникации из посевного ферментатора переводят приготовленную посевную культуру, при этом объем содержимого в основном ферментаторе увеличивается до 60 м^3. Его перемешивают 30 мин и отбирают пробу для определения рН, концентрации сахара и микробиологической чистоты. После зарядки ферментатора все продуктовые коммуникации промывают стерильной горячей водой и пропаривают 1 ч.

Режим ферментации. Аэрация. Аэрацию и перемешивание среды в эрлифтных ферментаторах следует рассматривать как единый процесс, так как нельзя аэрировать среду, не вызывая ее перемешивания. В первые 2—3 ч после засева ферментатора, например вместимостью 100 м^3, подают воздуха 100—150 м^3/ч. Раствор сразу сильно вспенивается, поэтому вводят 75—100 мл олеиновой кислоты или соответствующее количество другого пеногасителя. Образование пены вызвано содержащимися в питательной среде сапонином, азотистыми веществами и пектинами. Пена не влияет на процесс ферментации, но снижает полезный объем ферментатора и, кроме того, может вызвать вторичное заражение, возвращаясь из воздушной ловушки. Чтобы избежать заражения, ловушки надо устанавливать ниже головки ферментатора.

В дальнейшем воздух подают по следующему графику (по практическим данным) — табл. 24.

Таблица 24

График подачи воздуха в ферментатор

Время от начала ферментации, ч	Количество воздуха, м^3/ч	Время от начала ферментации, ч	Количество воздуха, м^3/ч
4—5	400	14—15	1200
6—7	550	16—17	1400
8—9	750	18—19	1600
10—11	900	20—21	1900
12—13	1150	22—24 и далее	2200

Как при подращивании мицелия, так и при ферментации непрерывно изменяются параметры культуры, скорость растворения и потребления кислорода грибом, поэтому для обоснования интенсивности аэрации необходимо экспериментально изучить связь между ними в различные периоды культивирования.

Отработавший воздух, содержащий примерно на 3—5 % меньше кислорода, чем исходный, через трубопровод и индивидуальную ловушку удаляют в атмосферу. По окончании ферментации ловушку открывают, тщательно моют водой и протирают 1%-ным раствором активированной хлорной извести или 1%-ным раствором хлорамина.

Гриб потребляет только растворенный в жидкости кислород, поэтому он вместе с воздухом сначала абсорбируется (растворяется) в ней, а затем путем диффузии мигрирует к мицелию. Мерой абсорбции газа в жидкости, насыщенной им, является коэффициент абсорбции — объем газа в литрах, поглощаемый 1 л жидкости при 0 °C и парциальном давлении 101,325 кПа (760 мм рт. ст.).

Зависимость растворимости газов от давления выражается законами Генри — Дальтона, согласно которым объем газа, растворенного в данном объеме жидкости, не зависит от давления, но масса его будет пропорциональна давлению, так как пропорционально изменится плотность газа в единице объема. При растворении смеси газов каждая составная часть этой смеси растворяется пропорционально своему парциальному давлению и коэффициенту абсорбции (растворимости). Коэффициенты абсорбции кислорода и азота в воде соответственно равны $4{,}89 \cdot 10^{-2}$ и $2{,}39 \cdot 10^{-2}$. С повышением температуры они уменьшаются и при 30 °C равны $2{,}70 \cdot 10^{-2}$ и $1{,}40 \cdot 10^{-2}$. В присутствии минеральных и органических примесей в воде растворимость кислорода уменьшается. В растворах свекловичной мелассы (300 г/л) она составляет около 75 % от растворимости в воде.

Скорость растворения кислорода в жидкости выражается уравнением массообмена:

$$K_D = K_L a (C_0 - C),$$

где K_D — скорость абсорбции кислорода, кг $O_2/(м^2 \cdot ч)$; K_L — коэффициент переноса кислорода в жидкость, $см \cdot ч^{-1}$; a — поверхность раздела фаз газ — жидкость, приходящаяся на единицу объема, $м^2/м^3$; C_0 — концентрация кислорода в жидкости при полном насыщении ее, которое может быть достигнуто при данной температуре и парциальном давлении кислорода в воздухе, кг $O_2/м^3$; C — фактическая концентрация кислорода в жидкости, кг $O_2/м^3$.

Величина $K_L a$ зависит от состава питательной среды и типа аэрирующего устройства. Степень диспергирования воздуха определяется аэрирующим устройством, однако лишь в слое жидкости высотой до 1 м. С увеличением высоты слоя размеры пузырьков воздуха не зависят от первоначальной дисперсности, по мере движения вверх они сливаются в более крупные, поэтому в эрлифтных ферментаторах воздух тонко не диспергируют.

Растворение зависит от степени турбулизации среды, парциального давления кислорода в воздухе, концентрации и pH среды. Турбулизация способствует растворению кислорода и передаче его к стенке клетки микроба. Чрезмерная турбулизация в аппаратах с мешалками и струйных ферментаторах может нарушить целость мицелия, усилить его рост и снизить способность к кислотообра-

зованию. Показателем устойчивости мицелия нитчатых грибов к механическим воздействиям является скорость перехода мононуклеотидов РНК из мицелия в культуральную жидкость, которая при разрушении мицелия возрастает.

В воздухе обычно содержится по объему 21 % O_2 и 78 % N_2, но добавлением кислорода концентрация его может быть повышена. В условиях производства давление воздуха в основном определяется высотой столба культуральной жидкости и ее плотностью в ферментаторе. При увеличении высоты ферментатора не только возрастает давление воздуха, но и увеличивается проходимый им путь, улучшая кислородообмен и снижая расход воздуха. Растворимость уменьшается с увеличением концентрации среды и pH, увеличивается с повышением внешнего давления над ферментируемой средой.

В процессе ферментации вязкость культуральной жидкости очень сильно повышается за счет выросшего мицелия (рис. 18 [59]). При этом растворению кислорода препятствует не только вязкость, но и частицы твердой фазы, в том числе мицелий, вызывающие усиленную десорбцию газа и уменьшение растворимости кислорода.

Культуральная жидкость с мицелием является неньютоновской [88], [109], т. е. при возрастании напряжения сдвига измеряемый коэффициент вязкости ее падает. Изменение коэффициента K_La в зависимости от содержания мицелия A. niger (на сухое вещество) в ферментаторе высотой 8 м приведено на рис. 19 [89]. В высоковязких жидкостях существенное значение приобретает

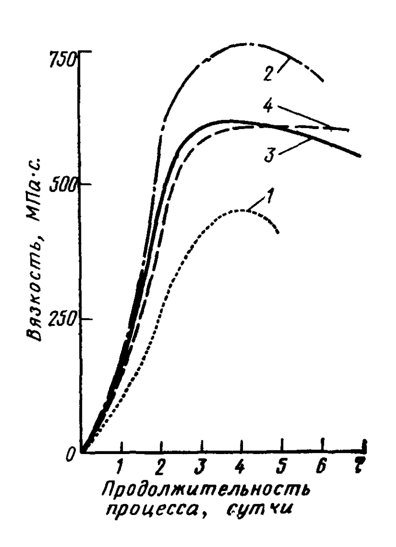


Рис. 18. Изменение вязкости культуральной жидкости при ферментации. Номера кривых указывают вариант определения.

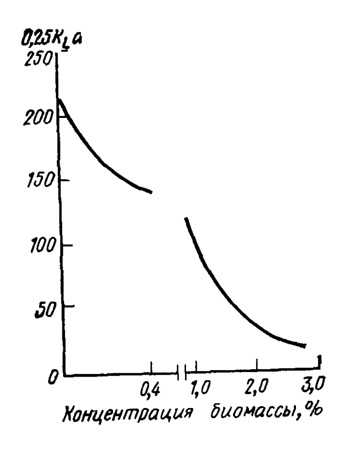


Рис. 19. Изменение величины K_La в зависимости от концентрации биомассы A. niger.

массопередача жидкость — микроорганизм, тогда как массопередача воздух — жидкость уже не играет доминирующей роли.

Однако при малой растворимости кислорода в среде, которого для гриба хватает не надолго, необходим постоянный приток кислорода. В отличие от поверхностного способа, при глубинном перерывы в аэрации более неблагоприятно сказываются на ферментации. Это объясняется не только значительным дефицитом кислорода, но и тем, что один из метаболитов — диоксид углерода, растворимость которого примерно в 40 раз больше, чем кислорода, отрицательно влияет на обмен веществ. Перерыв в аэрации в первые сутки после засева подросшим мицелием в течение 30 мин снижает содержание лимонной кислоты в культуральной среде на 13 %, перерыв на 60 мин — на 20 % [103].

В настоящее время сжатый воздух получают от ротационных воздухонагнетателей Хабаровского завода «Энергомаш». Воздухонагнетатели типа Э-200-31-1 имеют производительность до 12 000 нм³/ч и избыточное давление 0,3 МПа; типа 3-70-31-1 — производительность 4200 нм³/ч, избыточное давление 0,28 МПа. Первые снабжены электродвигателем мощностью 680 кВт, вторые — 250 кВт. По сравнению с компрессорами они имеют бо́льшую производительность, что уменьшает удельные капитальные затраты на сжатие воздуха, на 20—25 % уменьшает расход электроэнергии; упрощается обслуживание и снижаются затраты на ремонт. Получаемый воздух не содержит масла, присутствие которого в ферментируемой среде, как и большинства пеногасителей, вредно отражается на абсорбции кислорода (масло образует вокруг пузырька воздуха пленку, препятствующую растворению кислорода в среде).

На заводах лимонной кислоты применяется упрощенная схема стерилизации сжатого воздуха, вследствие чего периодически наблюдаются значительные вспышки инфекции. Воздух, поступающий в воздухонагнетатели, должен забираться выше конька крыши завода, не быть химически и сильно микробиологически загрязнен со стороны основного направления ветров. При озеленении территории завода воздух становится чище.

Схема подготовки сжатого воздуха должна предусматривать следующие операции: перед сжатием воздуха очистку его от пыли в фильтре любой конструкции, дешевом и оказывающем незначительное сопротивление. В воздухонагнетателе в процессе сжатия воздух нагревается летом до 115—120 °С, зимой меньше, охлаждается в трубчатом теплообменнике водой и поступает в ресивер (воздухосборник), назначение которого — аккумулировать воздух и отделять от него влагу. Затем воздух проходит фильтры предварительной грубой очистки от микрофлоры. Это, как правило, цилиндрические сосуды с насадкой (кольца Рашига, металлическая стружка и др.), смоченные висциновым, веретенным или трансформаторным маслом. Хотя они дают бактериальный проскок около 10 %, но значительно облегчают дальнейшую стерилизацию воздуха.

Воздух температурой несколько ниже точки росы (для предотвращения намачивания фильтрующих материалов) перед поступлением в ферментаторы проходит индивидуальные фильтры окончательной, тонкой очистки. Она проводится волокнистыми фильтрующими материалами с развернутой поверхностью, имеющими большую удельную поверхность фильтрации (до 200 $м^2/м^3$) и оказывающими низкое сопротивление фильтрации. Проскок составляет 10^{-4}—10^{-6}, что удовлетворяет условиям производственной ферментации. Еще лучшие результаты дают синтетические нетканые фильтрующие материалы, обладающие и антимикробным действием, базальтовое волокно.

В летнее время, чтобы обеспечить надлежащее охлаждение сжатого воздуха, особенно в южных районах, где градирня не может значительно снизить температуру оборотной воды, следует использовать воду из артезианских скважин или искусственно охлажденную.

Приведенная выше схема очистки сжатого воздуха окажет значительное сопротивление его потоку и, возможно, потребует установки воздухонагнетателей с бо́льшим избыточным давлением.

Температура ферментируемой среды должна быть 31—32 °С. При энергичном образовании лимонной кислоты температура повышается вследствие экзотермичности реакций дыхания и образования лимонной кислоты. Для поддержания температуры на оптимальном уровне через рубашку корпуса или эрлифтной трубы пропускают холодную воду. Одновременно снижают температуру поступающего в ферментатор сжатого воздуха до 24—20 °С.

При повышении температуры, даже кратковременном, мицелий разрастается интенсивнее и снижает активность. При понижении температуры задерживается рост мицелия. В обоих случаях образуется большее количество побочных кислот.

Подливы мелассной среды. Через сутки после засева, когда подросший мицелий разрастается и начинается интенсивное образование лимонной кислоты, проводят подливы более концентрированной мелассной среды (20—25 % по сахару). Среду подливают периодически (по 5—20 л в один прием на 1 $м^3$ геометрического объема) или непрерывно до заполнения объема ферментатора примерно на 80 %. Подливы обычно начинают, когда в культуральной жидкости общая кислотность достигнет 1,5—2 %, а содержание сахара уменьшится до 0,4—0,8 %. В дальнейшем концентрацию сахара поддерживают на уровне 0,8—1,2 %.

Подливы проводят с интервалами по 1,5 ч и заканчивают на третьи сутки от начала ферментации. Суммарная концентрация сахара составляет 12—13 % в расчете на исходный объем среды в ферментаторе (60 $м^3$ в 100 $м^3$ ферментаторе). После подливов ферментируемая среда сильно пенится, поэтому в нее добавляют немного пеногасителя. Если по окончании подливов образуется много мицелия и среда становится очень густой, в ферментатор доливают немного стерильной воды.

При каждом периодическом подливе концентрация сахара в среде возрастает и требуется определенное время, чтобы гриб адаптировался к ней и продолжал продуцировать кислоту. При непрерывных подливах концентрация сахара на значительном отрезке времени остается практически постоянной, обеспечивая непрерывное кислотообразование и сокращение длительности цикла ферментации.

Инфицирование. Защита среды от попадания посторонней микрофлоры, т. е. обеспечение асептических условий — одно из основных требований при культивировании A. niger. Однако бывает заражение дрожжами, пенициллами и неспороносными бактериями (Esch. coli и другими из группы кишечной палочки). Чаще других встречается дрожжевое заражение, при этом дрожжевые клетки располагаются на мицелии гроздьями. Близость условий их жизнедеятельности к микроскопическим грибам приводит к сложному взаимодействию между ними и затрудняет борьбу с дрожжевой инфекцией.

Иногда возникает заражение пенициллом, который паразитирует на мицелии A niger и разрушает его. Споровые бактерии (Bac. megaterium и др.) не получают заметного роста, так как быстро нарастающая кислотность вызывает их споруляцию.

В присутствии посторонней микрофлоры задерживается рост A. niger и может произойти даже полное его подавление; в большей или меньшей степени снижается образование лимонной кислоты. Происходят изменения и в морфологии гриба: гифы утолщаются, становятся узловатыми, кончики — тупыми, раздвоенными в виде вилочки, цитоплазма — зернистой, с большим числом вакуолей.

Завершение ферментации. Если титруемая кислотность в двух пробах, взятых в конце ферментации, с интервалом 4—8 ч, не нарастает, то ферментацию заканчивают. Прекращают подачу воздуха, нагревают культуральную жидкость паром до 65—70 °С и переводят в сборник. Чтобы мицелий не оседал, не забивал расходный штуцер и воздухораспределительное устройство, культуральную жидкость из ферментатора удаляют при перемешивании воздухом, создавая небольшое избыточное давление его.

После каждого завершенного цикла ферментации определяют съем C лимонной кислоты, т. е. количество ее (в кг), полученное в пересчете на 1 м^3 геометрического объема ферментатора в среднем за сутки, по формуле

$$C = \frac{PS}{V(T_0 + T_f)\cdot 100},$$

где P — общее количество органических кислот в культуральной жидкости в пересчете на лимонную кислоту и ее моногидратную форму, полученное за цикл, кг; S — содержание моногидратной лимонной кислоты в культуральной жидкости от общей кислотности, %; V — геометрический объем ферментатора, м^3; T_0 — продолжительность подготовительных и завершающих операций, сут (в ферментаторе 100 м^3 обычно 0,75); T_f — продолжительность кислотообразования (от начала засева подросшим мицелием до слива культуральной жидкости).

Съем лимонной кислоты колеблется в пределах 8—10 кг. Иногда определяют еще биологический съем, т. е. количество лимонной кислоты, полученное с 1 м^3 ферментатора за время только T_f.

Расход мелассы на 1 т лимонной кислоты (моногидратной) в процессе ферментации:

$$Q = AS/(46B),$$

где A — количество загруженной мелассы, т; S — содержание сахара в загруженной мелассе, %; B — полученное количество лимонной кислоты, т; 46 — условное содержание сахара в мелассе, %.

Выход лимонной кислоты к сахару в %:

$$K = B \cdot 100/(AS'),$$

где S' — содержание сахара в мелассе, доли единицы.

Содержание кислот в культуральной жидкости, определенное методом титрования гидроксидом натрия с фенолфталеином как индикатором, меньше действительного, так как не оттитровываются кислоты, в том числе и лимонная, связанные в виде солей. Из быстрых методов более правильные данные о содержании лимонной кислоты может дать экстракционно-фотометрический, основанный на разложении солей и специфической реакции с пентабромацетоном (с. 43).

Общую кислотность культуральной жидкости выражают в пересчете на моногидратную лимонную кислоту как конечный продукт производства. При этом каждому миллилитру точно 0,1 н. раствора гидроксида натрия, пошедшего на титрование пробы, соответствует 0,007 г лимонной кислоты.

Активность кислотообразования (кг/ч):

$$A = (V_2C_2 - V_1C_1)/\tau,$$

где V_2 и V_1 — конечный и начальный объемы ферментируемого раствора, м^3; C_2 и C_1 — концентрация кислоты в конечное и начальное время, кг/м^3; τ — продолжительность периода, ч.

Скорость биосинтеза лимонной кислоты единицей массы мицелия:

$$q = P/(m\tau),$$

где m — средняя масса мицелия за период τ, кг.

Отделение и промывка мицелия

Отделение мицелия и отмывку от него лимонной кислоты проводят на барабанных вакуум-фильтрах БОК (рис. 20) непрерывного действия в две ступени (об устройстве фильтров см. с. 161). Культуральную жидкость из приемного сборника *1* центробежным насосом *2* подают в корыто вакуум-фильтров I ступени *3*, где мицелий отделяют. Культуральный раствор собирают в сборнике *7*, а мицелий — в сборнике *4*. В этот сборник подают горячую воду в соотношении 4 : 1 (температура около 100 °С), тщательно перемешивают мешалкой и насосом *6* передают в корыто вакуум-фильтров II ступени *5*. Промывную воду собирают в сборник *8* и вместе с основным фильтратом из сборника *7* подают на химическую переработку, а промытый мицелий направляют в сборник *9* и удаляют.

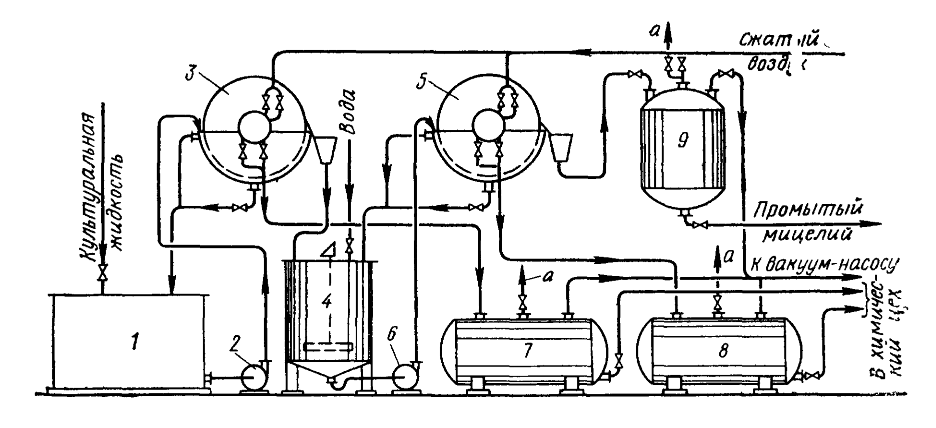


Рис. 20. Технологическая схема фильтрования культуральной жидкости (*а* — воздушник).

В фильтре создается разрежение 40 кПа. Мицелий снимается с барабана под избыточным давлением 0,07 МПа в соответствующих секциях его или с помощью вакуумного собирателя. Содержание кислоты в отмытом мицелии не должно превышать 0,2 %.

Другие способы глубинной ферментации

Отъемно-доливной способ ферментации заключается в том, что при активно протекающем процессе продолжают подливать мелассную среду с соответствующими предварительными отъемами культуральной жидкости. В начале ферментацию ведут по режиму, обычному для периодического способа, затем в 3—4 приема или непрерывно подливают дополнительное количество среды. Подлив прекращают за 36 ч до конца процесса ферментации, продолжающейся 12 сут. Суммарное количество сахара за цикл составляет около 30 % в пересчете на исходный объем (при начальной 3%-ной концентрации). В период дополнительных подливов поддерживают 1,2—1,5%-ную концентрацию сахара. Перед каждым подливом добавляют столько воды, сколько ее увлечено отработавшим сжатым воздухом, и небольшое количество минерального азота.

При ферментации отъемно-доливным способом увеличивается среднесуточный съем лимонной кислоты с 1 м^3 ферментатора за счет уменьшения частоты его зарядок при том же выходе кислоты по массе сахара.

Непрерывный способ ферментации. Сотрудниками Ленинградского завода лимонной кислоты испытан способ непрерывной ферментации в одном аппарате. Когда концентрация сахара в культуральной жидкости в условиях, характерных для периодического способа, понизится до 0,2—0,5 %, приступают к непрерывной подаче малассной среды концентрацией 20—25 % по

сахару в таком количестве, чтобы концентрация сахара постоянно находилась в пределах 0,2—0,5 % и культуральная жидкость непрерывно отбиралась.

Отмечено, что в процессе непрерывной ферментации A. niger изменяет морфологию и проявляет бо́льшую кислотообразующую способность, чем в периодическом. Недостатком непрерывной ферментации в одном аппарате является проскок неферментированного сахара и невозможность осуществления профилактической стерилизации без прерывания процесса. Проведение ферментации в нескольких последовательно соединенных аппаратах не имеет этих недостатков и более перспективно, о чем свидетельствует опыт непрерывного спиртового брожения.

Проблема непрерывной ферментации ждет еще своего решения. С целью оптимальной организации процесса и возможности управления им в первую очередь должны быть проведены исследования по физиологии A. niger в условиях проточной ферментации (питание, рост, изменение метаболизма и сверхсинтез лимонной кислоты при лимитации элементов питания и в зависимости от величины pH и rH_2 среды).

Ферментация сред большей концентрации. Как уже отмечалось, на зарубежных заводах начальная концентрация сахара в мелассной среде составляет 12—15 %, подливов не делается, что упрощает технологию и снижает опасность инфицирования посторонними микроорганизмами. Мицелий подращивают при pH около 6 в течение 22—24 ч.

В конце процесса содержание мицелия такое же, как в среде меньшей концентрации (18—20 г безводного в 1 л), но кислотообразующая способность его значительно выше.

Ферментация гранулированным мицелием с насыщением среды кислородом. На основании исследований С. М. Мартина шведская фирма Swenske Sockerfabriks разработала способ, согласно которому сначала получают шарикообразный мицелий размером 0,2—0,5 мм на 6—7 %-ной (по сахару) мелассной среде, обработанной гексацианоферроатом калия, стерилизованной с последующим добавлением азотных и фосфорных солей, при pH 5,7—5,9, температуре 30 °C и при продувании воздуха 5—7 л/л среды в 1 ч. Гранулятор (цилиндрический сосуд) имеет лопастную мешалку с тормозными планками для турбулизации. Среда засевается конидиями A. niger штамма MPCA, выделенного Висконсинским университетом (США), склонного к грануляции. Норма засева 10^{10} конидий/л среды. Выращивание длится около 12 ч, при этом в среде накапливается $1{,}5 \cdot 10^8$ гранул, что соответствует концентрации при засеве основного ферментатора $1{,}5 \cdot 10^5$ гранул/л среды. Гранулы представляют собой прочные шарики, в которых находится по 500—600 проросших конидий.

Основную ферментацию ведут в 15 %-ной мелассной среде с начальным pH около 7,0. Эту среду готовят так же, как и среду для выращивания гранул. Когда pH понизится до 4,7—5,0, в среду добавляют минеральную кислоту или кислые соли и доводят pH до 3,0 или несколько меньшей величины. Одновременно с этим в культуральную жидкость начинают подавать воздух, обогащенный кислородом (1:1), или кислород в количестве 5 л/л жидкости в 1 час. Подачу его продолжают до конца процесса, который заканчивается через четверо суток. В случае подачи воздуха, обогащенного кислородом, давление в ферментаторе поднимают выше атмосферного.

Считают, что избыток кислорода не позволяет мицелию расти, хотя это, по-видимому, может быть достигнуто и регулированием содержания свободного гексацианоферроата и некоторых других ингибиторов в процессе ферментации. Благодаря применению гранулированного мицелия (регулированию величины засева) и кислорода, затраты сахара на рост мицелия и его дыхание сокраща-

ются, а выход лимонной кислоты (в расчете на моногидрат) повышается до 100 % к усвоенному сахару. По данным фирмы, расход кислорода на 1 т безводной кислоты составляет 250—300 м³. Культуральная жидкость (с гранулированным мицелием) имеет примерно такую же динамическую вязкость, как и исходная среда, и не содержит щавелевой кислоты.

Вместо кислорода Г. Шлегелем рекомендовано добавлять к ферментируемой среде пероксид водорода. 1 л 30 %-ного раствора H_2O_2 после разложения дает 100 л кислорода (эквивалентных примерно 500 л воздуха). Так как избыток пероксида водорода может быть агрессивным не только по отношению к металлу, но и к живым клеткам, для снижения его концентрации необходимо добавлять фермент каталазу.

Ферментация иммобилизованными клетками и повторное использование мицелия. В последние годы за рубежом проведены исследования по синтезу лимонной кислоты на сахарозных средах клетками A. niger, иммобилизованными на коллагеновых мембранах. Это позволяет многократно использовать содержащиеся в мицелии ферменты и снизить расход сахара на образование биомассы гриба. Продолжительность полужизни ферментов достигает 140 ч, массообмен ухудшается и скорость кислотообразования составляет около 50 % по сравнению со свободным мицелием.

Имеются патенты на повторное использование мицелия для ферментации путем отделения его в стерильных условиях и промывания раствором поваренной соли. При непрерывных способах предусматривается возвращение части культуральной жидкости с мицелием из последующих чанов в предыдущие.

ПОВЕРХНОСТНАЯ ФЕРМЕНТАЦИЯ

В 1917 г. И. Карри (США) впервые селекционировал продуктивный штамм A. niger и разработал способ поверхностной ферментации. Этот способ с небольшими изменениями применяется и до сих пор во всех странах.

Ферментационные камеры

Основным оборудованием ферментационного цеха являются камеры — закрытые помещения прямоугольной формы, в которых на стеллажах в несколько ярусов расположены кюветы. Передняя стенка камеры выходит в коридор-тамбур и в ней имеется герметически закрывающаяся дверь. Остальные стены общие с соседними камерами. Стены кирпичные, штукатуренные, пол асфальтированный или покрытый кислотоупорными плитками с тщательной заделкой швов и с уклоном к центру камеры, трапом и гидравлическим затвором. Кровля сделана с уклоном к боковой стене, чтобы конденсат пара не попадал на верхнюю кювету.

Внутри камеры на двух-трех стеллажах расположено по 8—10 кювет из алюминия толщиной 4—5 мм или нержавеющей стали. Для безопасности обслуживания кромки кювет отбортовывают и тщательно зачищают. Размеры кювет зависят от размера камер и не превышают в ширину 1,8 м и в длину 7 м. Борта делают высотой до 20 см. Кюветы имеют уклон в сторону сливных штуцеров не менее 3 мм на 1 м длины. Расстояние между дном вышележащей кюветы и кромкой борта нижележащей не менее 25 см, от пола до дна нижней кюветы — 45 см, от стен — 80 см и между стеллажами — 1,5 м. Общая площадь кювет в камере

достигает 500 м² и более, высота камеры 4—5 м, отношение объема камеры к площади кювет — около единицы.

Заполнение кювет питательной средой и слив из них культуральной жидкости проводится через штуцеры в дне кювет, соединенные резиновыми шлангами со стояком, находящимся вне камеры. Шланги перекрывают винтовыми зажимами. Верхняя часть стояка соединена с продуктовой коммуникацией подготовительного отделения, нижняя — с коммуникацией химического цеха. Для заполнения кювет и слива растворов можно использовать переливные стаканы.

Вентиляция в камерах приточно-вытяжная: принудительная приточная, естественная вытяжная. Она обеспечивает воздухом нужной температуры и создает некоторый напор, что исключает подсос неочищенного воздуха. Вентиляционные установки бывают индивидуальные (на каждую камеру) или групповые (одна на несколько камер). Индивидуальные предпочтительнее, они позволяют более гибко регулировать климатический режим в камерах на разных стадиях ферментации. На рис. 21 изображена установка для очистки воздуха и его кондиционирования по температуре.

Камера имеет две группы воздуховодов. По первой из них воздух подают в нижнюю часть стеллажей с движением над кюветами с небольшой скоростью. По второй группе, имеющей отводы над каждой кюветой от воздушного стояка, подают основное количество воздуха, движущегося быстрее и равномернее.

Вытяжную вентиляцию устраивают таким образом, чтобы исключить попадание отработавшего воздуха из одной камеры в другую и коридоры. Выброс отработавшего воздуха в атмосферу должен быть удален на значительное расстояние от воздуховодов, забирающих свежий воздух. Последние располагают на 2—3 м

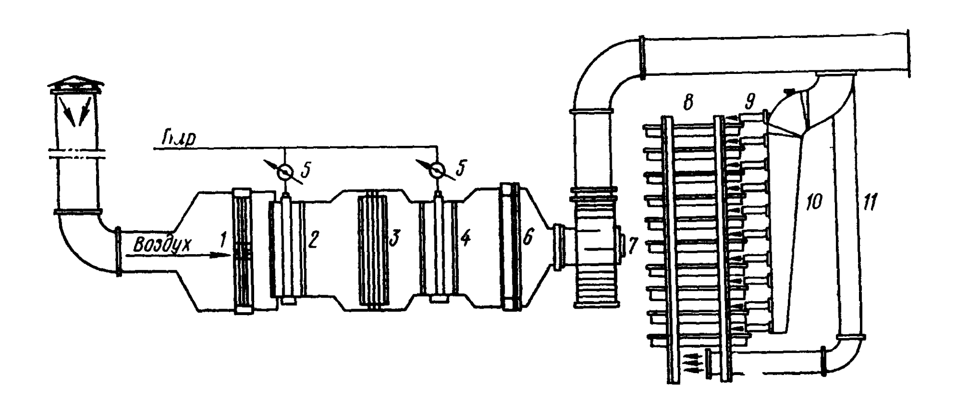


Рис. 21. Схема установки для стерилизации воздуха:

1 — сухой фильтр; *2* — калорифер для предварительного подогрева воздуха; *3* — масляный фильтр; *4* — калорифер для окончательного подогрева воздуха; *5* — терморегулятор; *6* — сухой фильтр; *7* — вентилятор; *8* — кюветы; *9* — штуцер для засева конидий; *10* — верхний воздушный стояк; *11* — нижний воздуховод.

ниже выброса отработавшего воздуха и в стороне от потенциальных источников инфекции.

Для наблюдения за внешним видом грибной пленки на передней стене камеры сделаны окна. Камера освещается электролампочками, защищенными водонепроницаемыми плафонами, расположенными в задней стене, а у смотровых окон — в передней стене лампочками пониженного напряжения. Кроме того, камеру оснащают паровыми и водяными коммуникациями, вакуумным устройством для удаления мицелиальной пленки.

Стерилизация ферментационных камер

После окончания ферментации, сливания культуральной жидкости и удаления мицелиальной пленки камеру готовят к очередному циклу — ее моют и стерилизуют. Моют кюветы, стеллажи, потолок, стены и пол из брандспойта теплой водой, применяя щетки. Затем в кюветы наливают кипящую воду, приготовленную в варочном аппарате, и после 30-минутного выдерживания спускают, а остатки сгоняют специальными досками. Отводы от кювет к стояку и сам стояк промывают также горячей водой. После промывки кюветы вытирают сухими стерильными тряпками. Стены и пол камеры тщательно протирают 3%-ным раствором медного купороса, 3%-ным раствором кремнефтористого натрия или 3—4%-ным раствором формалина.

Ферментационную камеру закрывают и дезинфицируют пароформалиновой смесью, получаемой в переносном аппарате («формалиннике»). Пароформалиновую смесь подают через стояк и отводы к кюветам. Перед подачей ее камеру нагревают до 45 °С через установленную внизу паровую коммуникацию. Затем через формалинник и паровую коммуникацию температуру повышают до 65 °С. На 1 м^3 объема камеры расходуют 10—20 г формальдегида. При этой температуре камеру выдерживают 2—3 ч. Одновременно всю продуктовую коммуникацию, стояк и отводы к кюветам заполняют 1—2%-ным раствором формалина и выдерживают такое же время. Конденсат сливают, формалин дегазируют пароаммиачной смесью, подаваемой также из формалинника (0,57 кг аммиака на 1 кг формальдегида). Экспозиция составляет около 0,5 ч.

После подачи в камеру аммиака отводы от стояка к кюветам, стояк и продуктовые коммуникации до варочного аппарата и до сборников культуральной жидкости тщательно промывают горячей водой и пропаривают 15—20 мин. Кюветы наполняют горячей водой так, чтобы она переливалась через борта, и выдерживают 1—2 ч. Затем камеру охлаждают до 50—48°С, вентилируя ее стерильным воздухом температурой 25—30 °С через воздуховоды обеих групп. Воду из кювет спускают. На этом подготовку камеры заканчивают.

Допускается холодная стерилизация камер и всего оборудования растворами активированной хлорной извести, антиформина и хлорамина Б.

Широко применяют также синтетические моющие вещества и в первую очередь те, основу которых составляют катионактивные ПАВ, характеризующиеся неплохими моющими свойствами и очень высокой антимикробной активностью. К ним относятся катамин АВ — алкилдиметилбензиламмоний хлорид (четвертичное аммониевое соединение) (0,005—0,05%-ный раствор), алкилбензоламмоний хлорид, цетилпиридиний хлорид и цетилтриметиламмоний хлорид. Из синтетических моющих средств, содержащих анионактивные ПАВ, применяют сульфонолы, основу которых составляют натриевые соли алкилбензилсульфоновых кислот, обладающие хорошим моющим и антимикробным действием. К ним, в частности, относится сульфонол НП-3.

Ассортимент моющих порошков и паст с антимикробным действием сейчас значительно расширился. Производственное значение имеют «Дезмол», «Диас» и другие. Их применяют в виде растворов концентрацией 0,001 % в сочетании с 0,01—0,005%-ным раствором хлорной извести. Используют и антибиотики — полимиксин М и левомицетин (раствор из расчета 10—50 мг на 1 м² обрабатываемой площади).

Для стерилизации воздуха применяют фильтрующие ткани на основе ПАН-волокна, содержащего четвертичное аммониевое основание.

Зарядка камер

Подготовленные камеры заряжают — кюветы заполняют приготовленной мелассной средой и засевают конидиями A. niger. Подачу раствора начинают с верхних кювет слоем 12—18 см. Во время заполнения кювет вентиляцию ведут через воздуховоды первой группы температурой 30—32 °С в количестве 3—5 м³/ч на 1 м² поверхности кювет.

После заполнения кювет среду охлаждают до 35 °С воздухом, подаваемым через воздуховоды второй группы. При подаче воздуха не менее 3,5 м³/(м²·ч) через те же воздуховоды с помощью пульверизатора вводят конидии гриба из расчета 75 мг/м² площади кювет [44] и через 0,5—1 мин вентиляцию прекращают на 1 ч. При этом конидии оседают равномерно на поверхность среды. Подавать большее количество конидий при хорошо ферментируемой мелассе и стерильности во время прорастания конидий нецелесообразно, так как вследствие обильного роста это приводит к снижению выхода лимонной кислоты. Меньшее количество конидий также приводит к уменьшению выхода. При плохо ферментируемой мелассе засев конидиями увеличивают.

Конидии обладают водоотталкивающей силой и плохо смачиваются мелассной средой, что приводит к неравномерности ее засева. Прибавление ПАВ усиливает смачивание, равномерность распределения конидий по поверхности среды, увеличивает выход лимонной кислоты.

Формирование мицелиальной пленки и кислотообразование

В начальный период роста гриба и формирования пленки на поверхности среды необходимо поддерживать температуру на уровне 35 °С. По истечении часа после посева конидий температура начинает понижаться, поэтому возобновляют вентилирование через воздуховоды первой группы (вниз камер). Температура подаваемого воздуха должна быть около 50 °С, расход его — 3—5 $м^3/(м^2 \cdot ч)$.

Через 18—24 ч после посева образуется тонкая серовато-белая пленка мицелия. По истечении трех суток она сильно утолщается и покрывается густыми складками. Со вторых суток воздух температурой 40—45 °С подают через воздуховоды второй группы в количестве 7 $м^3/(м^2 \cdot ч)$.

Спустя 30—36 ч количество воздуха увеличивают до 10 $м^3/(м^2 \cdot ч)$, а температуру его снижают до 32—28 °С.

С началом активного кислотообразования температура культуральной жидкости повышается. Так как ее необходимо поддерживать на оптимальном уровне до конца ферментации, то с третьих суток расход воздуха увеличивают до 15—18 $м^3/(м^2 \cdot ч)$, а температуру его снижают до 25 °С. Примерно с восьмых суток, когда кислотообразование затухает, расход воздуха постепенно снижают до 12—15 $м^3/(м^2 \cdot ч)$.

При кислотообразовании выделяется много тепла; в период интенсивного кислотообразования — до 1000 $кДж/(м^2 \cdot ч)$. Оно отводится с помощью продувания воздуха, при этом испаряется и вода. Так как кондиционирование воздуха проводится обычно только по температуре, то при 75—85 %-ной относительной влажности выходящего из камеры воздуха испаряется до 50 % от начального объема среды в зависимости от высоты ее слоя на кювете.

Наряду с созданием оптимальных климатических условий наблюдают за ростом мицелия и состоянием грибной пленки. При полном или частичном отсутствии роста подсевают конидии, при потоплении пленки и инфицировании среду пускают на специальную переработку, а камеру тщательно стерилизуют. Начиная с пятых суток отбирают пробы для определения титруемой кислотности и неассимилированного сахара. К этому времени кислотность обычно достигает 6—8 %, а в каждые последующие сутки — возрастает не менее чем на 2—3 %. Ферментацию прекращают, когда в растворе остается около 2—3 % сахара от введенного. К этому времени кислотность достигает 20 %.

В настоящее время на заводах ферментацию ведут при исходной высоте слоя 12—18 см и концентрации сахара в среде 13—16 %. Влияние высоты слоя среды и концентрации сахара в среде на образование лимонной кислоты иллюстрируется графиками (рис. 22 и 23). Показатели процесса контролировались через 5, 7 и 9 сут (по данным лабораторных опытов [43]).

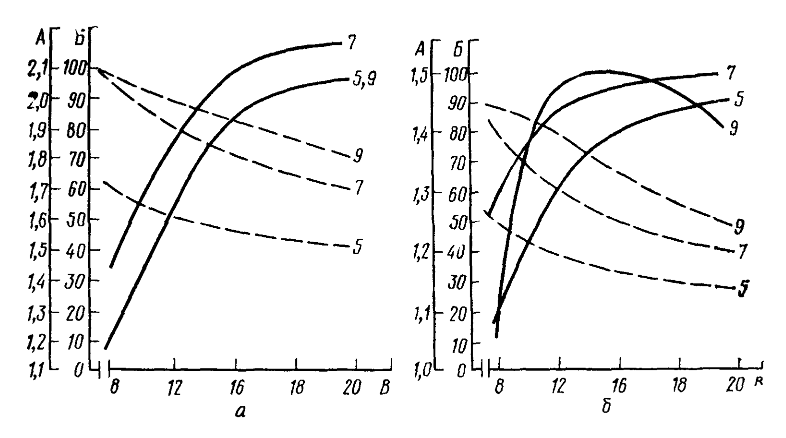


Рис. 22. Влияние высоты слоя ферментируемой среды из мелассы № 1 (*а*) и № 2 (*б*) при концентрации сахара 130 г/л на съем (сплошная линия) и выход лимонной кислоты (пунктир):

А — съем, кг/(м^2 · сут); *Б* — выход, % от массы сахара; *В* — высота слоя раствора, см; *5, 7, 9* — сутки ферментации.

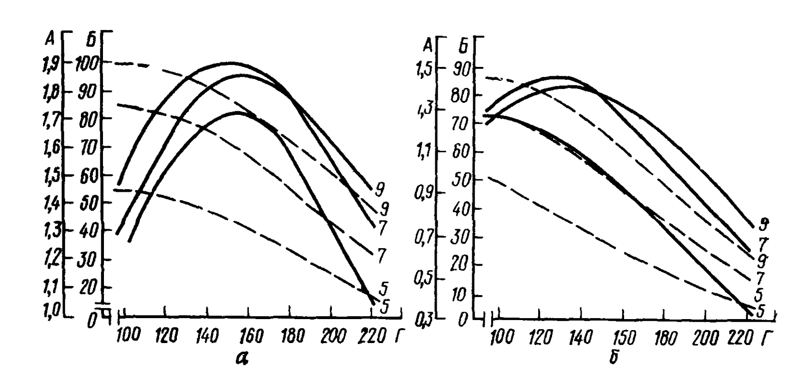


Рис. 23. Влияние концентрации сахара в ферментируемой среде из мелассы № 1 (*а*) и № 2 (*б*) при высоте слоя 12 см на съем и (сплошная линия) выход лимонной кислоты (пунктир):

А — съем, кг/(м^2 · сут); *Б* — выход, % от массы сахара; *Г* — концентрация сахара, г/л; 5, 7, 9 — сутки ферментации.

Из рис. 22 видно, что для среды из хорошо ферментируемой мелассы (№ 1) с увеличением высоты слоя от 8 до 20 см съем кислоты возрастает с пятых по седьмые сутки, а затем снижается. При этом тем больше, чем выше слой мелассной среды. На девятые сутки при слое 8 см съем был равен 1,47 кг/(м^2·сут), при 19,5 см — 2,21. Выход лимонной кислоты возрастал до девятых суток, но абсолютная величина его на последние сутки при слое 8 см составляла 98,2 %, при 19,5 см — 73,0.

Примерно аналогичный характер изменений наблюдался и для среды из плохо ферментируемой мелассы (№ 2). Максимальный съем в большинстве случаев также приходился на седьмые сутки, но был значительно ниже: при слое 8 см — 1,28 кг/(м²·сут), при 19,5 см — 1,48. Выход лимонной кислоты на девятые сутки составлял при слое 8 см 87,1 %, при 19,5 см — 50,4 %. Для обоих образцов мелассы при всех исследованных высотах слоев с увеличением продолжительности ферментации возрастает содержание лимонной кислоты в общей сумме кислот.

Из рис. 23 следует, что для хорошо сбраживаемой среды при увеличении концентрации сахара съем лимонной кислоты возрастает и достигает максимальной величины на седьмые сутки. При увеличении концентрации сахара со 180 до 220 г/л съем кислоты достигает максимума только на девятые сутки. Перемещение максимума понятно, если принять во внимание реальное количество сахара, находящегося в растворе в каждые сутки ферментации.

В противоположность съему, выход лимонной кислоты на девятые сутки с увеличением концентрации систематически снижается и весьма сильно: в интервале концентраций 100—160 г сахара в 1 л он был 98,2—84,1 %, в интервале концентраций сахара 180—220 г/л — 70,2—49,5 %. Выход лимонной кислоты с пятых по девятые сутки при всех концентрациях сахара возрастает. Таким образом, с увеличением исходного содержания сахара в среде выход лимонной кислоты, как и при увеличении высоты слоя среды, уменьшается, что сопровождается возрастанием количества неассимилированного сахара, худшими показателями разделения кислот, повышенным синтезом клеточного вещества гриба и его дыханием (см. табл. 20 и 21 на с. 96).

Общая тенденция показателей ферментации плохо ферментируемой мелассы была такой же, но они были менее удовлетворительными.

Оптимальное значение высоты слоя и концентрации сахара в растворе находилось по точкам пересечения кривых съема и выхода лимонной кислоты, соответствующим наилучшим показателям в пяти-девятисуточный отрезок времени. Для среды концентрацией сахара 130 г/л (рис. 22, *а*), приготовленной из хорошо ферментируемой мелассы, кривые пересеклись на девятые сутки в точке, соответствующей наилучшим показателям кислотообразования и приходящейся на 16-см слой среды. Кривые на рис. 23, *а*, характеризующие влияние концентрации сахара в среде той же мелассы при высоте слоя 12 см, пересеклись на концентрации сахара около 140 г/л. Следовательно, ферментирование среды из мелассы хорошего качества должно вестись 9 сут при высоте слоя около 16 см и концентрации сахара около 130 г/л; при высоте слоя 12 см — с исходной концентрацией 140 г/л.

Пользуясь кривыми рис. 22, *б* и 23, *б* найдено, что при сбраживании среды, приготовленной из мелассы плохого качества, высота слоя не должна превышать 12 см и концентрация сахара должна быть в пределах 120—130 г/л.

Правильность установления оптимальных высоты слоя и концентрации сахара в нем подтверждена экономическим расчетом [41].

Оптимальная нагрузка по сахару на 1 м² площади кювет может быть принята: для хорошей мелассной среды 17—20 кг, для плохой — 15 кг.

Расход сахара на дыхание (см. табл. 20 и 21) в значительной степени зависит от исходной концентрации сахара, высоты слоя питательной среды и качества мелассы. Чем больше были исходная концентрация сахара и высота слоя среды, хуже качество мелассы, тем больше сахара расходовалось на дыхание. Очень высокий расход сахара на дыхание в экстремальных условиях (большие концентрация и высота слоя среды), характеризующихся сильно возросшим осмотическим давлением и содержанием токсичных веществ, по-видимому, частично можно объяснить необходимостью более интенсивного дыхания гриба для его выживания.

Данные, соответствующие 36—38%-ному и даже большему расходу сахара на дыхание, отмечены только при неблагоприятных условиях ферментации, при благоприятных же расход сахара на дыхание был примерно в три раза меньше. По теоретическому расчету [110], при 80%-ном расходе сахара на образование лимонной кислоты 20 % сахара должны затрачиваться на синтез биомассы и дыхание A. niger. За вычетом 6—8 % сахара, пошедшего на синтез биомассы и 1—2 % на образование побочных кислот, только 11—12 % его приходится на дыхание.

В приведенных выше опытах расход сахара на синтез клеточного вещества гриба в хорошо ферментируемой мелассной среде колебался незначительно и в большинстве случаев был в пределах 6—8 % по массе потребленной сахарозы. Из рис. 24 видно, что с увеличением высоты слоя и концентрации сахара в среде возрастает и количество мицелия. На среде, приготовленной из плохой мелассы, вырастает значительно меньше мицелия, что, вероятно, и является одной из причин низкого съема и выхода лимонной кислоты.

Ферментация мелассной среды поверхностным способом является открытым процессом, который, несмотря на частичную очистку воздуха, все же не защищен от инфицирования посторонними микроорганизмами. Этому способствуют исходная кислотность питательной среды, близкая к нейтральной, состав среды, содержащей все необходимые питательные вещества, и почти суточный отрезок времени, пока вырастет мицелий.

Питательная среда заражается Esch. coli, Aerobacter aerogenes, Bact. fluorescens, Klebsiella sp., Alcaligenes faecalis, Pseudomonas aeroginosa, Enterobacter cloacae, Proteus vulgaris, Lactobacillus, Leuconostoc, Streptococcus, Mycoderma, Candida, Torulopsis. Основным антагонистом A. niger является Esch. coli. Размножаясь в мелассных средах, она угнетает развитие гриба и его кислотообразование, а иногда и полностью прекращает жизнедеятель-

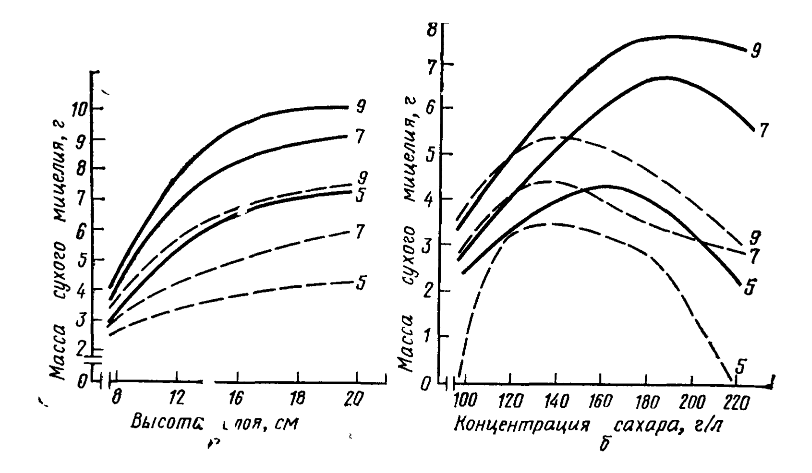


Рис. 24. Влияние высоты слоя ферментируемой мелассной среды (*а*) при исходной концентрации сахара 130 г/л и различной концентрации сахара (*б*) при высоте слоя 12 см на образование массы мицелия:
меласса № 1 — сплошная линия; меласса № 2 — пунктир; 5, 7, 9 — сутки ферментации.

ность гриба. Вредны и другие бактерии и микроорганизмы, потребляющие сахар и выделяющие метаболиты, токсичные для A. niger.

Заражение Esch. coli и другими бактериями происходит в течение первых 24 ч. Термостойкие бациллы, споры которых остаются в мелассных средах после стерилизации, могут также прорастать в течение первых суток. Поэтому нередко бывает важно стимулировать прорастание конидий A. niger с тем, чтобы не дать сильно размножаться посторонним микроорганизмам и не мешать развитию мицелия A. niger.

Бактерии попадают в готовые среды в основном с воздухом, водой, а также в результате вторичного заражения — из коммуникаций, застойных жидкостей на полу и других. Способы подавления их были рассмотрены на с. 141. Однако вследствие 10-кратного пассирования на средах, содержащих антимикробные вещества, у бактерий развивается резистентность, и их нужно заменять другими.

Очень часто происходит заражение Penicillium purpurogenum и Pen. rugulosum. Эта плесень очень распространена, находится в почве, гниющих овощах, фруктах и особенно в воздухе вблизи овощехранилищ и баз. Пенициллы не поселяются на мелассные среды, а паразитируют на мицелии A. niger. Развитие пенициллов происходит быстрее, чем A. niger, и благодаря содержащемуся в них богатому набору ферментов они разрушают его клетки. Под влиянием пенициллов мицелий A. niger понижает кислотообразующую способность, становится мягким, пропитывается субстратом, нередко тонет. Пенициллы привержены к более низким температурам, что проявляется, в частности, в том, что они поражают

пленки A. niger на нижних кюветах и нуждаются в большей относительной влажности воздуха.

Главный ингибитор пенициллов — свободный гексацианоферроат калия. Фунгицидное действие проявляют и растворы хлорокиси, бенлейта (отечественные аналоги — арилат и узген) и метабен, β-нафтиловый эфир дихлоруксусной кислоты, пара-, орто- и метаизомеры хлордихлорацетанилидов, монохлоруксусная кислота.

Заражение пенициллом может быть ранним или поздним, в соответствии с чем антимикробные препараты добавляют в питательную среду или распыляют над поверхностью пленки A. niger. Из других способов борьбы с пенициллом эффективно понижение относительной влажности воздуха и усиление аэрации [до 17—26 $м^3/(м^2 \cdot ч)$], повышение температуры до 35 °С.

Завершение ферментации

По окончании ферментации прекращают подачу воздуха в камеру, культуральную жидкость сливают в сборники химического цеха, под пленку гриба подливают горячую воду для отмывки кислоты от мицелия. Через 1—1,5 ч промывную воду сливают, а мицелий снимают, начиная с верхних кювет. Пленку гриба подгребают скребками к подвешенной на борту металлической воронке, разрывают на крупные куски массой до 20 кг и сбрасывают в нее. Воронка соединена трубопроводом с вакуум-сборником (запарником). На чехословацких заводах стеллажи вместе с кюветами выкатывают из камеры, наклоняют и сбрасывают мицелий в запарник.

Затем камеру моют, стерилизуют и подготавливают к очередному циклу, как указано выше (см. с. 141).

Для каждого завершенного цикла ферментации определяют съем лимонной кислоты в расчете на 1 $м^2$ площади кювет в среднем за сутки цикла по формуле, аналогичной приведенной для глубинной ферментации, только в знаменателе вместо V подставляют суммарную площадь кювет в камере F, $м^2$, T_0 — для камер с площадью кювет 100—300 $м^2$ принимают 24 ч, для камер 300—500 $м^2$ — 30 ч, для камер больше 500 $м^2$ — до 36 ч; T_f — продолжительность от посева конидий до слива культуральной жидкости, сут. Съем лимонной кислоты должен быть не менее 1,2—1,3 $кг/(м^2 \cdot сут)$.

Отмывка мицелия от кислоты

Извлечение из мицелия остатков лимонной кислоты и уничтожение посторонней микрофлоры проводится в мицельном отделении. В запарнике (с ложным днищем) заливают мицелий водой и нагревают через барботер паром до 100 °С. Полученный слабый раствор кислоты затем собирают в приемнике, из которого насосом подают на фильтр-пресс и из сборника фильтрованных растворов — в химический цех. Концентрация ли-

монной кислоты в растворе 2—4 %. Отмытый мицелий с содержанием кислоты не более 0,2 % удаляется из запарника шнеком в автомашины.

Другие способы поверхностной ферментации

Изложенный выше способ называют бессменным. По сменному способу после сливания культуральной жидкости под пленку A. niger вводят немного воды температурой 30—32 °С, выдерживают 0,5 ч, промывную жидкость сливают, вводят свежую мелассную среду и ферментируют. По доливному способу ферментации на четвертые-пятые сутки под пленку A. niger доливают свежую среду в количестве, компенсирующем уменьшение объема вследствие испарения влаги. При работе этими способами экономится расход конидий, реже перезаряжаются камеры и появляется возможность ферментировать низкокачественные мелассы, не пригодные для выращивания грибной пленки.

Периодические способы имеют ряд недостатков: ферментация происходит с небольшой скоростью; мицелий по окончании цикла выбрасывают, хотя он еще активен, а получение нового мицелия связано с затратой конидий, мелассы и времени на его выращивание; во всех кюветах трудно поддерживать заданную температуру (колебания по высоте кювет иногда доходят до 10 °С), поэтому ферментация происходит неравномерно.

Предложенные непрерывные способы предусматривают протекание мелассной среды по каскаду кювет под предварительно выращенной пленкой мицелия A. niger [19] или под секциями его, движущимися на транспортере в одном направлении со средой в плоском ферментаторе туннельного типа.

Для ускорения диффузии по периодическому способу были предложены: охлаждение среды с помощью водяных рубашек и змеевиков в кюветах для усиления конвекции, вибрация стеллажей, принудительная циркуляция ферментируемой среды с помощью насоса, периодическое удаление лимонной кислоты из ферментируемой среды ионообменом. Для повышения выхода лимонной кислоты проверено действие магнитных полей на конидии перед посевом и электронно-ионное насыщение аэрирующего воздуха, все эти способы по тем или иным причинам не нашли практического применения.

Наряду с поверхностным способом ферментации на жидких средах за рубежом известны способы ферментации на твердых средах. Например, стерильную багассу (остаток после извлечения сока из сахарного тростника) смачивают стерильным 15 %-ным раствором (по сахару) мелассы в соотношении 5:1, распределяют по кюветам, засевают конидиями и выдерживают в термостатных аэрируемых камерах при температуре 30 °С в течение 6—7 сут. Лимонную кислоту затем экстрагируют водой и выделяют из раствора цитратным способом.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЕФЕКТНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ЖИДКОСТЕЙ

Дефектными считают питательные среды, не пригодные для ферментации вследствие грубых ошибок, допущенных при их приготовлении, и нестерильности, что в большинстве случаев может быть установлено уже в конце первых суток ферментации с помощью методов химического и микробиологического контроля. В случае ошибок в приготовлении питательных сред и возможности их немедленного исправления приготовленные надлежащим образом среды после стерилизации вновь направляют на ферментацию.

При поверхностной ферментации в случае ненормального роста мицелиальной пленки дефектную среду сливают в сборник, кипятят, охлаждают до 35 °С и подливают под трех-четырехсуточную

пленку мицелия 2—3 раза из расчета не более 20 л на 1 $м^2$ площади кювет за один прием. При неудовлетворительной поверхностной и глубинной ферментациях дефектные культуральные жидкости сливают в сборник, фильтруют, стерилизуют и упаривают вместе с цитратным фильтратом для получения концентрата.

Культуральные жидкости, слабо инфицированные бактериальной или дрожжевой флорой, после слива, стерилизации и охлаждения используют на зарядку камер, сильно инфицированные перерабатывают на концентрат вместе с цитратным фильтратом. Культуральные жидкости из отдельных кювет, на которых, несмотря на дополнительный подсев конидий, мицелий не вырос, в зависимости от степени инфицирования используют для подливов или упаривают с цитратным фильтратом.

Сброс дефектных жидкостей в канализацию запрещается.

СРАВНЕНИЕ ПОВЕРХНОСТНОГО И ГЛУБИННОГО СПОСОБОВ ФЕРМЕНТАЦИИ

При одинаковой мощности заводов капитальные затраты на строительство зданий ферментационных цехов примерно в два раза больше при поверхностном способе ферментации главным образом из-за постройки камер. Стоимость же оборудования для него, наоборот, в 1,3—1,5 раза меньше и большая часть его изготовляется на месте. Общие единовременные затраты на здания и оборудование для глубинного способа на 20—30 % меньше при большей величине быстро изнашиваемого оборудования.

Затраты на электроэнергию при глубинном способе ферментации в несколько раз выше. Энергия тратится в основном на получение сжатого воздуха. При поверхностном способе ферментации воздух подается под очень небольшим давлением и расход его меньше. Затраты на обслуживающий персонал несколько больше при поверхностном способе, так как подготовка камер и снятие мицелия с кювет требуют больших затрат ручного труда.

Себестоимость лимонной кислоты несколько ниже при поверхностном способе ферментации. Этот способ имеет и другие преимущества: выше концентрация лимонной кислоты в культуральной жидкости, значительно меньше образуется побочных кислот, вследствие чего затрачивается меньше мелассы при ферментации и меньше потери при химической переработке культуральных жидкостей. При поверхностном способе гриб менее чувствителен к перерывам в аэрации. Обслуживание и контроль процесса ферментации просты, проблемы возникают только при необходимости поддержания требующейся температуры воздуха в камере при высокой температуре наружного воздуха (в районах с жарким летом).

Глубинный способ позволяет перерабатывать широкий набор углеродсодержащего сырья, он не так требователен к качеству мелассы, что на общем фоне его ухудшения является важным

достоинством. Скорость ферментации по этому способу выше, в одном аппарате сразу получается большое количество культуральной жидкости и она не собирается по многочисленным кюветам, что упрощает технологию. Ферментация ведется в стерильных условиях, являющихся необходимой предпосылкой для перехода на непрерывный, полностью механизированный и автоматизированный процесс, устраняющий ручной труд.

Если поверхностный способ исчерпал свои потенциальные возможности, устарел, то глубинный отвечает всем требованиям современной биотехнологии и находится в стадии развития. Освоение непрерывной ферментации повысит производительность и экономичность процесса. В отечественной промышленности, производящей лимонную кислоту, новые заводы строятся только для работы по глубинному способу ферментации, а существующие заводы с поверхностным способом ферментации постепенно переводятся на глубинный.

Глава 8. ВЫДЕЛЕНИЕ И ПОЛУЧЕНИЕ КРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

Технологическая схема химической переработки культуральной жидкости в кристаллическую лимонную кислоту приведена на рис. 25.

Она дана в упрощенном варианте: не выделены в отдельные операции осаждение оксалата кальция и осветление раствора лимонной кислоты активным углем, не включена ионитная очистка и переработка маточных растворов.

СОСТАВ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ И ЕЕ УЧЕТ

Сухих веществ в культуральной жидкости содержится 16—27 г/100 мл при поверхностном способе ферментации, 9—16 г — при глубинном. В состав их входят 12—20 г органических кислот при поверхностном способе и 5—12 г — при глубинном. Лимонная кислота в сумме органических кислот составляет соответственно 97—99 и 80—85 %. При поверхностном способе ферментации из побочных кислот присутствуют в основном глюконовая кислота, при глубинном — щавелевая и глюконовая, мало промежуточных кислот ЦТК (яблочной и др.). Кроме органических кислот содержатся неассимилированный грибом сахар (0,5—2,0 % при поверхностном способе, 0,2—0,5 % — при глубинном), бóльшая часть несахара мелассы.

Культуральную жидкость и жидкость, полученную при отмывке лимонной кислоты от мицелия, перерабатывают вместе, а промывную жидкость из запарников используют для разбавления загрязненных маточных растворов. Культуральную жидкость и промывную жидкость в химическом цехе принимают в калиброванную

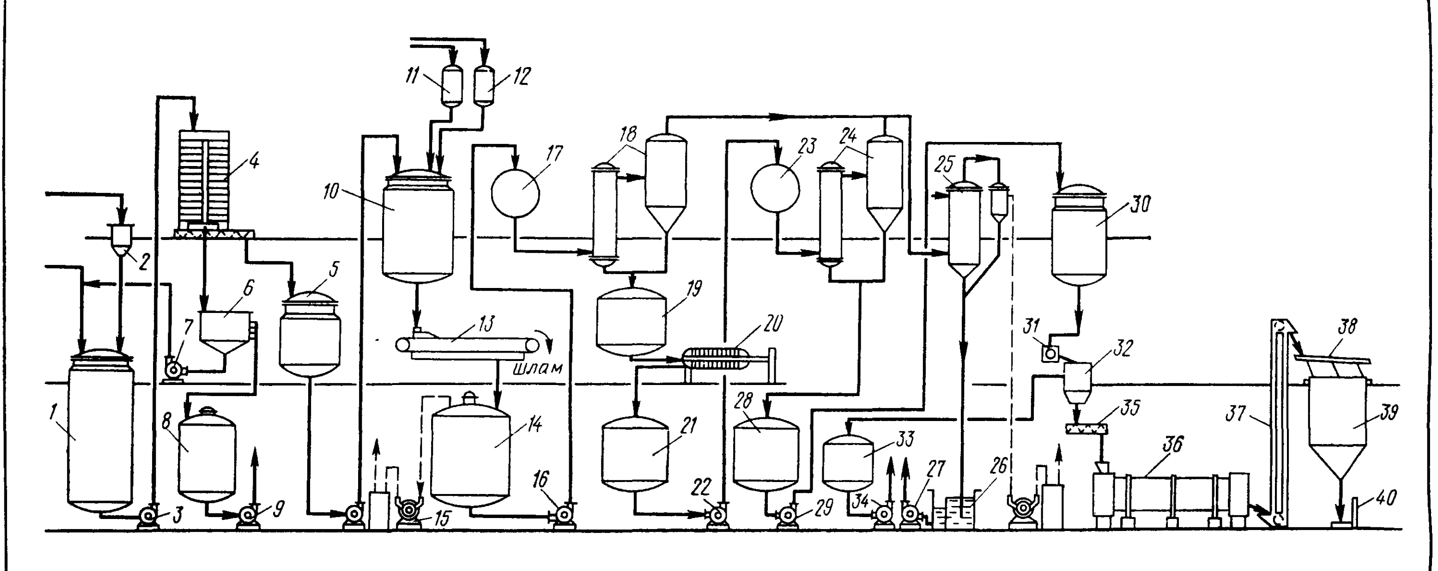


Рис. 25. Технологическая схема химического цеха:

1 — нейтрализатор; *2* — сборник известкового молока; *3* — насос для перекачивания цитратной суспензии; *4* — фильтрпресс ФПАК-М для отделения цитрата; *5* — сборник цитратной суспензии; *6* — отстойник фильтрата; *7* — насос для возвращения отстоявшегося цитрата в нейтрализатор; *8* — сборник фильтрата; *9* — насос для перекачивания фильтрата на концентрирование; *10* — реактор (расщепитель) для разложения цитрата серной кислотой; *11* — мерник серной кислоты; *12* — мерник раствора гексацианоферроата калия; *13* — ленточный вакуум-фильтр для отделения гипсового шлама; *14* — вакуум-сборник раствора лимонной кислоты; *15* — вакуум-насос; *16* — насос для перекачивания раствора лимонной кислоты; *17* — сборник раствора лимонной кислоты; *18* — вакуум-аппарат первого выпаривания; *19* — сборник раствора после первого выпаривания, при фильтровании работающий как монжус; *20* — рамный фильтрпресс для отделения гипса, выпавшего во время выпаривания раствора; *21* — сборник фильтрованного раствора; *22* — насос для перекачивания раствора; *23* — сборник раствора; *24* — вакуум-аппарат второго выпаривания; *25* — барометрический конденсатор с отделителем капель воды; *26* — барометрический ящик; *27* — насос для удаления барометрической воды; *28* — сборник раствора лимонной кислоты после второго выпаривания; *29* — насос; *30* — кристаллизатор; *31* — распределитель утфеля по центрифугам; *32* — центрифуга; *33* — сборник первого маточного раствора; *34* — насос для подачи маточного раствора на переработку; *35* — питатель; *36* — сушилка; *37* — элеватор; *38* — сито-трясучка с воздушным охлаждением кристаллов лимонной кислоты; *39* — бункер лимонной кислоты; *40* — весы.

емкость, перемешивают и замеряют количество. В отобранных пробах определяют общую кислотность и содержание лимонной кислоты.

ОЧИСТКА КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ

Перед осаждением цитрата целесообразно очистить культуральную жидкость от взвешенных веществ (обрывков мицелия, коллоидов и др.) центробежным сепарированием или тщательной фильтрацией на различного рода фильтрах. При значительном содержании щавелевой кислоты в культуральной жидкости выделяют и ее, что позволяет получить более чистый цитрат кальция и увеличить скорость фильтрации цитратной и гипсовой суспензий.

Попытки применить для очистки культуральной жидкости неионогенные, катионогенные флокулянты не дали положительных результатов: уменьшается скорость фильтрования цитратной суспензии, значительно увеличивается цветность растворов лимонной кислоты после разложения цитрата кальция серной кислотой.

Для осаждения щавелевой кислоты культуральную жидкость нагревают до 70—75 °С, перемешивают и нейтрализуют гидроксидом кальция (известковым молоком) до pH 2,7—2,9, но не выше 3,0. При этом в осадок выпадает оксалат кальция:

$$C_2H_2O_4 + Ca(OH)_2 \rightarrow CaC_2H_4 + 2H_2O.$$

Моноцитрат кальция остается в растворе.

Через 15 мин проверяют полноту осаждения оксалата по качественной реакции с 10%-ным раствором хлорида кальция. Реакцию считают законченной при наличии в пробе лишь опалесценции. Полученную суспензию оксалата кальция можно подогреть до 90 °С или без подогрева выдержать 30 мин для увеличения размеров кристаллов оксалата и ускорения фильтрования. Осадок отделяют на нутч-фильтре или центрифуге и промывают небольшим количеством воды.

Осаждение щавелевой кислоты ведут в реакторе из нержавеющей стали, снабженном механической мешалкой, паровым барботером и вытяжной трубой.

При очистке культуральной жидкости от щавелевой кислоты [76] увеличивается скорость фильтрования цитратной и гипсовой суспензий соответственно в два и три раза, уменьшается цветность раствора лимонной кислоты после разложения цитрата кальция серной кислотой в среднем на 50 %, что сокращает расход активного угля на его осветление.

Цитратная масса, выделенная от очищенной культуральной жидкости, представляет собой белый рассыпчатый порошок, который легко отмывается от красящих веществ водой (расход воды сокращается на 30—40 %).

Осадок оксалата окрашен, вязок, содержит 45—50 % влаги. Влажного оксалата получается 0,2—0,3 т на 1 т лимонной кис-

лоты. Скорость фильтрования оксалатной суспензии мала, примерно в 30 раз меньше скорости фильтрования цитратной и гипсовой суспензий, не содержащих оксалата кальция. Для ускорения фильтрования может быть добавлен непромытый гипсовый шлам. При этом отпадает необходимость в отдельной очистке культуральной жидкости от взвешенных веществ, которые удаляются вместе с гипсовым шламом и оксалатом.

Оксалат кальция может быть использован для получения щавелевокислого аммония, применяемого в производстве лимонной кислоты, или для получения щавелевой кислоты.

ПОЛУЧЕНИЕ ЦИТРАТА КАЛЬЦИЯ

Выделение лимонной кислоты из культуральной жидкости основано на ее свойстве образовывать малорастворимую соль — трехкальциевый цитрат.

Нейтрализация кислоты

Для получения трехкальциевого цитрата лимонную и другие органические кислоты, содержащиеся в культуральной жидкости, нейтрализуют известковым молоком до $pH > 6$. При этом идут реакции: с лимонной кислотой

$$2C_6H_8O_7 + 3Ca(OH)_2 \rightarrow Ca_3(C_6H_5O_7)_2 + 6H_2O;$$

с глюконовой кислотой

$$2C_6H_{12}O_7 + Ca(OH)_2 \rightarrow Ca(C_6H_{11}O_7)_2 + 2H_2O.$$

и со щавелевой кислотой (см. с. 153), если она предварительно не выделялась. Цитрат и оксалат кальция выпадают в осадок, глюконат кальция хорошо растворим и вместе с основным количеством других компонентов культуральной жидкости остается в растворе.

Для полноты осаждения лимонной кислоты в виде трехкальциевого цитрата необходимо создать некоторый избыток ионов кальция в растворе (увеличением количества добавляемого известкового молока или 2,5—3,0 % хлорида кальция к массе лимонной кислоты в культуральной жидкости). Однако для определения оптимальных условий осаждения лимонной кислоты известью необходимо знать растворимость трехкальциевого цитрата в фильтрате. Как показывает табл. 24 [20], растворимость его при постоянной температуре в зависимости от pH раствора подвержена некоторым колебаниям, но имеет величину на порядок больше, чем в чистой воде (см. табл. 13 на с. 39), что объясняется влиянием примесей, находящихся с цитратом кальция в сложном, недостаточно выясненном взаимодействии.

Цитрат кальция наименее растворим при pH 6,1 и 7,5 и в пределах 60—90°C растворимость его практически не зависит

Таблица 25

Растворимость цитрата кальция в фильтрате культуральной жидкости (г/100 мл)

pH раствора	Температура, °С			
	60	70	80	90
6,1	0,196	0,198	0,198	0,197
7,1	0,215	0,219	0,221	0,223
7,2	0,233	0,226	0,215	0,214
7,3	0,251	0,248	0,241	0,243
7,5	0,205	0,202	0,201	0,202

от температуры. По другим данным [113], наименьшая растворимость цитрата и потери лимонной кислоты с фильтратом наблюдаются при температуре 90 °С (рис. 26).

Потери лимонной кислоты (в виде цитрата в фильтрате и промывной жидкости) уменьшаются с увеличением концентрации лимонной кислоты в культуральной жидкости примерно до 15 % (рис. 27 [50]). Возрастание потерь в основном связано с увеличением количества фильтрата по отношению к содержащейся лимонной кислоте. Увеличение концентрации лимонной кислоты сверх 15 % ухудшает структуру цитрата и фильтруемость суспензии.

Потери лимонной кислоты с фильтратом зависят также от доброкачественности культуральной жидкости (содержания в ней лимонной кислоты по отношению ко всем сухим веществам в растворенном состоянии), pH и продолжительности осаждения (рис. 28 [113]). Оптимальным является pH около 7,0, при pH ниже 7 растворяется больше цитрата, при pH выше 7 ухудшается фильтрация, возможно, вследствие пептизации коллоидов. Так как

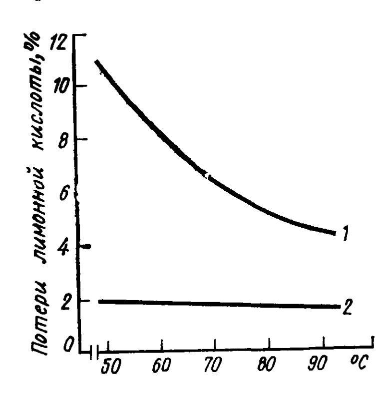
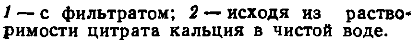


Рис. 26. Потери лимонной кислоты в зависимости от температуры осаждения цитрата кальция:


1 — с фильтратом; 2 — исходя из растворимости цитрата кальция в чистой воде.

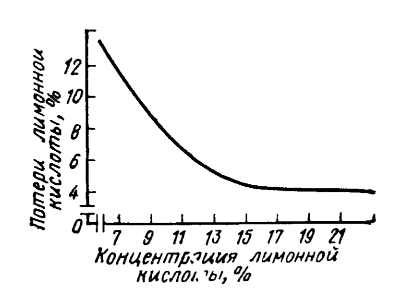


Рис. 27. Влияние концентрации лимонной кислоты в культуральной жидкости на ее потери.

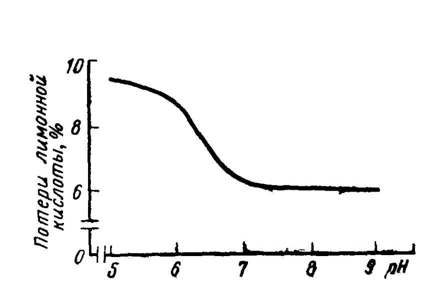


Рис. 28. Потери лимонной кислоты в зависимости от величины pH при осаждении цитрата кальция.

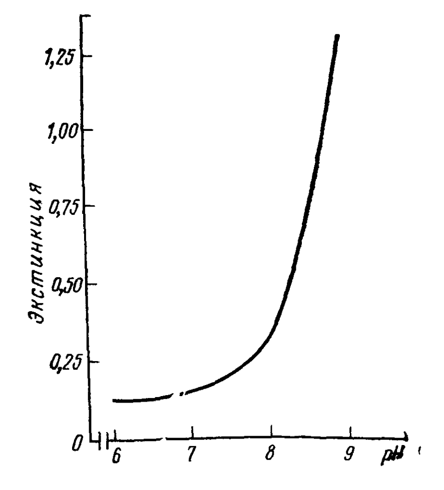


Рис. 29. Цветность раствора лимонной кислоты в зависимости от величины pH при осаждении цитрата кальция.

растворимость извести очень мала, частички ее имеют определенную степень дисперсности и лимонная кислота является сравнительно слабой кислотой, то реакция требует некоторого времени.

Большое значение имеет цветность раствора лимонной кислоты, получающейся при разложении цитрата серной кислотой (рис. 29 [113]). Она возрастает, если цитрат осаждать при pH выше 7, и на осветление необходимо затратить больше активного угля.

Учитывая значительную растворимость цитрата кальция в фильтрате, вызывающую основную потерю лимонной кислоты при химической переработке культуральной жидкости (4—5 %), осаждение ведут в оптимальных условиях. Не следует слишком разбавлять культуральную жидкость раствором от промывки мицелия, а известковое молоко нужно готовить более концентрированным. Существенную роль при осаждении цитрата и в последующих процессах играет качество извести (см. с. 158).

Минеральные примеси, соосаждающиеся с цитратом кальция, вносятся в основном с известковым молоком [75]. В извести они находятся, вероятно, в связанной форме ($CaO \cdot Al_2O_3$, $12CaO \cdot 7Al_2O_3$, $3CaO \cdot Al_2O_3$, $2CaO \cdot SiO_2$, $2CaO \cdot Fe_2O_3$, $4CaO \cdot Al_2O_3 \cdot Fe_2O_3$) и частично без изменения остаются в цитрате. При обжиге известняков окись магния взаимодействует с глинистыми примесями и минеральной частью топлива и может также образовывать соединения, аналогичные окиси кальция. Соединения Al, Fe, Zn, Cu соосаждаются в виде их гидроокисей. При наличии в культуральной жидкости щавелевой кислоты возможно выпадение Mg, Mn, Cu, Zn в виде труднорастворимых оксалатов.

Получение цитрата кальция в наиболее чистом виде имеет очень важное значение для последующей очистки лимонной кислоты. Поэтому желательно дальнейшее тщательное изучение процесса нейтрализации с обращением внимания главным образом на получение цитрата в ясно выраженной кристаллической форме. По-видимому, это вполне достижимо, о чем свидетельствует способ Fest Alpine/Vogelbusch (Австрия).

Нейтрализацию ведут в реакторах (нейтрализаторах), выполненных из кислотоупорной стали, — в цилиндрических емкостях вместимостью от 6 до 16 м^3, снабженных вытяжной вентиляцией и паровым барботером. Нейтрализаторы заполняют культуральной жидкостью не больше чем до половины общего объема. Во время перекачивания ее в нейтрализаторы иногда добавляют раствор хлорида кальция в количестве 2,5—3 % безводного хлорида к общей массе раствора лимонной кислоты для полноты осаждения цитрата (хотя, как показали исследования, это добавление не обязательно).

Известковое молоко медленно подают из мерника прерывистой струей или через делитель струи при непрерывно работающей мешалке (частота вращения при нейтрализации 80 об/мин, при выдерживании — 40). В растворе контролируют pH с помощью индикаторной бумажки или pH-метром. Нейтрализация суспензией технического углекислого кальция (мела) не желательна. Хотя он нередко бывает чище извести, но нейтрализация сопровождается сильным вспениванием вследствие образования диоксида углерода. Кроме того, pH автоматически устанавливается на величине 5,5—5,9 и для доведения его до 7 приходится все равно добавлять известь.

Нейтрализуют культуральную жидкость различно. Раньше на отечественных заводах ее нагревали до кипения, нейтрализовали 90 % холодного известкового молока, поддерживая температуру не ниже 90 °С, затем доводили pH до 7 и кипятили около 15 мин.

Исходя из того, что температура нейтрализации в пределах 60—90 °С не оказывает влияния на потери лимонной кислоты с фильтратом (см. табл. 25), рекомендовано проводить нейтрализацию при 55 °С (известковым молоком такой же температуры). Поскольку реакция нейтрализации экзотермична, температура в конце нейтрализации повышается до 70—75 °С. Нейтрализацию заканчивают за 5—7 мин и продолжают перемешивание еще около 10 мин для созревания осадка. Реакция считается законченной, если pH реакционной массы (суспензии цитрата) равен 7±0,5.

На заводах ЧССР культуральную жидкость с концентрацией лимонной кислоты 12—13 % нейтрализуют известковым молоком на холоду до pH 5,5, при этом температура повышается до 45 °С за счет теплоты реакции. Затем реакционную массу нагревают открытым паром до 80 °С, добавлением известкового молока доводят pH до 6±0,2 и выдерживают при этой температуре и работающей мешалке 80 мин. Общая продолжительность нейтрализации составляет 120—150 мин. Как показывает та же табл. 25,

при pH 6,1 и температуре 80 °С растворимость цитрата такая же, как при 70—75 °С и pH 7±0,5.

Получение известкового молока

Известковое молоко приготовляют гашением извести водой. Заводы получают известь готовой или организуют собственное ее производство, обжигая известняковый камень в специальных (известняково-обжиговых) печах при температуре 1100—1200 °С.

Термохимические реакции обжига известняка и гашения извести водой:

$$CaCO_3 + 178 \text{ МДж} \rightarrow CaO + CO_2;$$

$$CaO + H_2O \rightarrow Ca(OH)_2 + 65 \text{ МДж}.$$

Известняковым камнем называют известняк плотного сложения; это — горная порода, образовавшаяся осаждением раковин и скелетов отмерших морских животных в отдаленные геологические периоды и сцементированная известковым веществом. Известняк, идущий для обжига в производстве пищевых кислот, должен содержать не менее 97 % $CaCO_3$, не более 1,5 % $MgCO_3$, 0,5 % полуторных оксидов (Fe_2O_3, Al_2O_3 и др.), 0,5 % оксида кремния и нерастворимых в HCl примесей [28].

Примесь $MgCO_3$ при обжиге превращается в MgO, который, реагируя с лимонной кислотой, образует растворимую соль (потери кислоты). Полуторные оксиды при гашении извести дают коллоидные растворы гидрата оксида, образующие с лимонной кислотой растворимые комплексные соединения. Кроме потерь кислоты, они еще затрудняют фильтрование цитратной суспензии. Оксид кремния при обжиге известняка реагирует с оксидом кальция, образуя легкоплавкую жидкую массу, которая обволакивает куски извести и переводит ее в неактивную форму. Оксид кремния частично коллоидно растворяется лимонной кислотой, резко ухудшая фильтрование.

Жженая известь представляет собой аморфный порошок или мелкие кубические кристаллы относительной плотностью 3,37. Она гигроскопична, из воздуха поглощает воду и диоксид углерода, превращаясь в $Ca(OH)_2$ и $CaCO_3$.

Состав жженой извести зависит от состава известнякового камня и режима обжига. Готовая известь должна содержать активной CaO и MgO не менее 90 %, в том числе MgO — не более 2 %, SiO_2 — не более 1,2 % и полуторных оксидов — не более 1 %. Непогасившихся зерен — не более 7 %.

При гашении извести эквивалентным количеством воды образуется рыхлая масса гидроксида кальция (гашеная известь, или пушонка). Он плохо растворим в воде — при 20 °С в 100 г воды 1,56 г $Ca(OH)_2$. Насыщенный раствор гидроксида кальция называется известковой водой. В промышленности пищевых кислот готовят так называемое известковое молоко — водную суспензию

$Ca(OH)_2$. Максимальная плотность его не превышает 1,2 г/см³. В 1 л такой суспензии содержится 0,28 кг CaO (в растворе и в осадке). При большей плотности известь оседает в трубопроводах и забивает их.

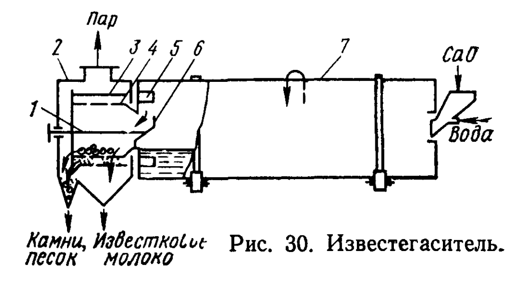


Рис. 30. Известегаситель.

При гашении извести выделяется тепло: на 1 кг CaO 1200 кДж и испаряется около 1,3 кг воды. Гашение ведут водой температурой до 80 °С при соотношении CaO : вода 1 : 4 или 1 : 5 в известегасильном барабане *7* (рис. 30) с частотой вращения 3,6 об/мин. Внутри барабана по винтовой линии расположены лопатки.

Известковое молоко и непогасившиеся куски извести перемещаются к карманам *5* и перебрасываются ими по лотку *6* в выгрузочное устройство (неподвижный кожух) *2*.

В нем размещены два цилиндра: внутренний перфорированный *4* жестко соединен с барабаном *7* и вместе с ним вращается. На его внешней и внутренней поверхности для вывода примесей закреплены ленты шнека. Наружный цилиндр *3* с нижней перфорированной стенкой неподвижно прикреплен к кожуху *2*. Лоток *6* прикреплен к штанге *1*. Поворотом штанги можно изменять его положение в пространстве с целью регулирования количества известкового молока, передаваемого с помощью карманов из барабана в выгрузочное устройство.

Известковое молоко процеживается через сита обоих цилиндров и выводится в песколовушку, а примеси, оставшиеся в цилиндре *4* и прошедшие цилиндр *3*, выводятся лентами шнеков в бункер отходов. Пар, образующийся при гашении извести, выводится из кожуха *2* в атмосферу. Гашение длится 10—20 мин.

Известковое молоко очищают от недопала и песка, изнашивающих оборудование и осложняющих технологические операции. Очистку ведут в три стадии: сначала удаляют крупные и непогасившиеся частицы извести размером более 10 мм — на внутреннем барабане; мелкие (размером меньше 10 мм) — в песколовушке Русселя — Дорошенко; тонкую очистку от частиц, размером менее 1 мм, — в гидроциклонах.

Песколовушка состоит из стального корытообразного корпуса, разделенного поперечными перегородками на 8—10 секций. Вдоль корпуса проходит стальной вал с насаженными на него перекидными черпаками и Г-образными лопастями мешалки. В первой секции, куда поступает молоко из известегасителя, установлен наклонный шнек для удаления осевшего песка. Известковое молоко из первой секции проходит последовательно все остальные и в каждой секции оседает некоторое количество песка, который при вращении вала захватывается черпаками и перебрасывается

ими через перегородки из одной секции в другую навстречу движению известкового молока.

Из последней секции песколовушки известковое молоко центробежным насосом через напорный бак подают на гидроциклон. В гидроциклоне суспензия приобретает вращательное движение, в результате которого возникают значительные центробежные силы. Под действием этих сил и разницы в массе извести и песка происходит их разделение. Песок, имеющий большую массу, прижимается к стенкам циклона, по спиральной траектории спускается вниз и удаляется из циклона. Установка состоит из двух последовательно работающих циклонов (верхний диаметром 0,15 м, нижний — 0,25 м).

Из второго гидроциклона очищенное известковое молоко сливается в сборник, а из него насосом перекачивается в мерник над нейтрализаторами. Концентрация известкового молока в зависимости от плотности приведена в табл. IX приложения.

Отделение цитрата кальция

Электронно-микроскопическое исследование осадка показывает, что цитрат кальция выделяется в виде мельчайших частиц, беспорядочно сцепленных между собой в агрегаты (клубки) диаметром 100—200 мкм. Суспензия при содержании в ней твердой фазы 155 г/л, плотности твердой фазы 1910 кг/м^3 и температуре осаждения 70—100 °С имеет удельную поверхность осадка S, соответственно равную 189—395 м^2/м^3, скорость фильтрования $w \cdot 10^3 = 22—18$ м/с [77]. Скорость фильтрования цитратных суспензий, полученных нейтрализацией культуральных жидкостей, при прочих равных условиях может значительно различаться, что связано с качественным и количественным составом примесей. Определенное влияние оказывает и инфицированность культуральной жидкости посторонними микроорганизмами.

Цитратную суспензию фильтруют на аппаратах различных конструкций: вакуумных нутч-фильтрах, барабанных вакуум-фильтрах и автоматизированных камерных фильтрпрессах с механическим зажимом плит (ФПАК-М). Все они выполнены из кислотостойкой стали.

Нутч-фильтры представляют собой открытые резервуары четырехугольной формы с высотой стенок до 1 м, имеющие ложное (перфорированное) днище, площадью фильтрации от 2,75 до 5,7 м^2. На ложное днище укладывают фильтровальную ткань. На заводах пищевых кислот в аппаратах для фильтрования применяют ткани типа «бельтинг», хлориновую и лавсановую. Чтобы не допустить чрезмерного уплотнения осадка, вначале фильтрование ведут под атмосферным давлением, когда же накопится достаточное количество осадка цитрата, создают разрежение до 53 кПа.

После удаления фильтрата цитрат тщательно промывают из брандспойта горячей водой. Во время фильтрации и при промывке

осадка поверхность его выравнивают веслом, не допуская растрескивания, нарушающего равномерность и полноту промывки. Промывку ведут быстро небольшими порциями воды, учитывая, что в ней растворяется цитрат и количество его в промывной воде зависит также от продолжительности их контакта. Расход промывной воды ограничивают в среднем 10 м³/т лимонной кислоты, содержащейся в цитрате, и температуру воды поддерживают не ниже 90 °С. Промывку оканчивают при отсутствии в промывной воде ионов хлора (проба с раствором $AgNO_3$), сахара (проба с растворами Фелинга при кипячении) и красящих веществ.

Промытый цитрат кальция после отжатия под разрежением имеет влажность около 65 %. Его нельзя долго хранить, так как он легко подвергается заражению микроорганизмами, которые разрушают лимонную кислоту. Фильтрат и промывные воды собирают отдельно. Последние порции малоконцентрированных промывных вод можно использовать повторно на промывку или для приготовления мелассных питательных сред.

Использование нутч-фильтров неэффективно. Они нуждаются в применении ручного труда. Вследствие высокой температуры суспензии и промывной воды возможны случаи травматизма, испарение влаги и высокая температура создают неблагоприятные условия труда. Процесс периодический. Разгрузка фильтра от осадка на многих заводах механизирована (опрокидывающиеся нутч-фильтры).

Барабанный вакуум-фильтр (рис. 31) состоит из горизонтального, вращающегося на цапфах ячейкового барабана, погруженного нижней частью в корыто с цитратной суспензией. Цилиндрическая перфорированная поверхность барабана обтянута фильтро-

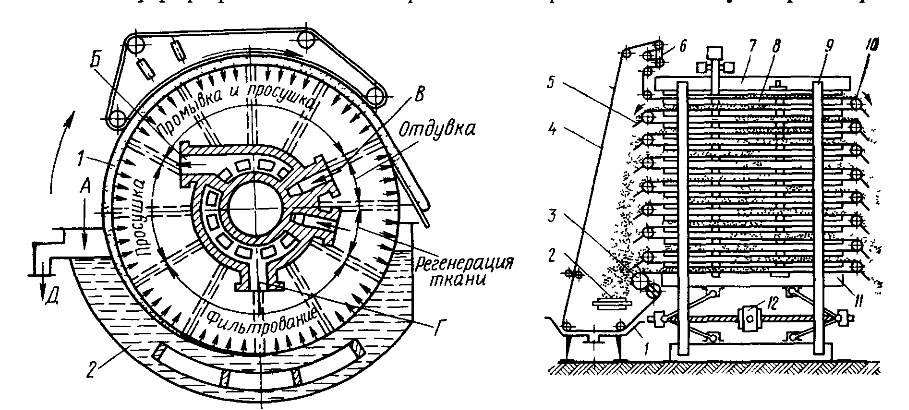


Рис. 31. Схема работы вакуум-фильтра:

1 — барабан фильтра; *2* — корыто для суспензии; *А* — суспензия; *Б* — промывные воды; *В* — сжатый воздух; *Г* — фильтрат; *Д* — перелив.

Рис. 32. Схема работы ФПАК-М:

1 — камера для регенерации ткани; *2* — транспортер для осадка; *3* — приводной барабан, *4* — фильтровальная ткань; *5* — нож для отделения осадка; *6* — натяжное устройство; *7* — верхняя опорная плита; *8* — фильтрующий элемент (плита и рама); *9* — вертикальные стойки; *10* — ролики; *11* — нижняя опорная плита; *12* — электромеханический зажим

6 Зак 1816

тканью. Ячейки барабана соединены трубами с каналами ячейковой цапфы, к торцевой поверхности которой прижата неподвижная распределительная головка. При вращении барабана головка соединяет его ячейки в зонах фильтрации и промывки с вакуум-трубопроводом, а в зонах съема осадка и регенерации ткани — с трубопроводом сжатого воздуха.

Цапфы барабана установлены в подшипниках, закрепленных на стойках корыта фильтра. В нем же расположена мешалка, совершающая поступательно-возвратное качание (частота качаний 81 в мин) и обеспечивающая поддержание суспензии во взвешенном состоянии. Вдоль барабана со стороны погружения его в суспензию укреплен нож для подхватывания отдуваемого осадка. Сверху барабан закрыт шатровой крышей. Над барабаном имеются форсунки и спринклер для разбрызгивания воды над осадком. Барабан приводится в движение от электродвигателя.

Промывать осадок на фильтре трудно, так как он легко размывается струями воды и смывается обратно в корыто. На заводах в ЧССР промывку ведут через ткань, натянутую на ролики сверху барабана и двигающуюся вместе с осадком (см. рис. 31).

Толщина осадка на фильтре 12—15 мм и регулируется частотой вращения барабана (около 0,3—0,5 об/мин). Разрежение в распределительной головке — 60—75 кПа, давление 0,07 МПа. Следует заметить, что фильтры непрерывного действия любых конструкций дают устойчивые показатели работы только при стабилизации концентрации исходной суспензии, чему должно быть уделено должное внимание.

На рис. 32 дана общая схема устройства и работы ФПАК-М. Аппарат состоит из нескольких попарно совмещенных плит и рам, расположенных горизонтально между верхней и нижней опорными плитами и связанных четырьмя вертикальными стойками, служащими направляющими для плит при их перемещении по вертикали. Сверху вдоль каждой плиты проходит фильтровальная ткань в виде бесконечной ленты, перемещаемой циклически. Лента приводится в рабочее состояние натяжным устройством, приводным барабаном и роликами.

Рис. 33 иллюстрирует действие фильтрующей части ФПАК-М. Фильтровальные плиты — фасонные, с камерами для отвода фильтрата, промывной жидкости и воздуха, покрытые перфориро-

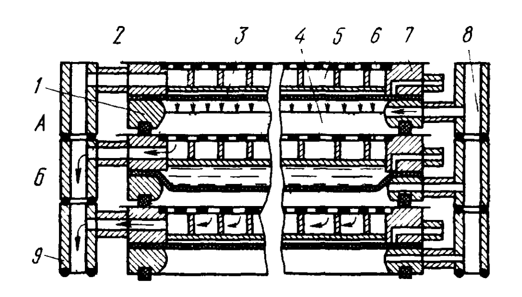


Рис. 33. Действие фильтровальной части ФПАК-М:

1 — рама; *2* — фильтровальная ткань; *3* — эластичная диафрагма; *4* — пространство в раме для суспензии, осадка, промывной жидкости и сжатого воздуха; *5* — камера для приема фильтра, промывной жидкости и сжатого воздуха; *6* — перфорированный лист; *7* — плита; *8* — коллектор для подачи суспензии, промывной жидкости и сжатого воздуха; *9* — коллектор для отвода фильтрата, промывной жидкости и сжатого воздуха.
А — момент фильтрования, *Б* — момент отжима осадка.

ванными листами. Между плитой и рамой расположены эластичные диафрагмы, которые при выполнении их из силоксановых каучуков стойки до температуры 100 °С.

При фильтровании, происходящем со сжатыми плитами и рамами, суспензия подается насосом под давлением до 0,25 МПа через коллектор в раму. Отжим жидкости (цитратного фильтрата) проводится диафрагмой, которая под водяным давлением до 0,9 МПа растягивается и нажимает на суспензию. Фильтрат проходит через ткань, перфорацию в плите и удаляется по коллектору.

На промывку осадка по тому же коллектору, что и для суспензии цитрата, подают горячую воду, затем ее отжимают, а осадок подсушивают воздухом. Давление промывной воды и сжатого воздуха около 0,25 МПа. По окончании подсушки плиты с рамами раздвигают, ленту из ткани приводят в движение и сбрасывают осадок. Одновременно регенерируют часть ткани в специальной камере водой, подаваемой в трубки, расположенные по обеим сторонам ленты.

Все операции цикла (фильтрование, промывка, обезвоживание и выгрузка осадка), а также зажимание и раздвигание плит с рамами автоматизированы. При этом продолжительность отдельных операций (по несколько минут) регулируется с помощью реле времени. Кроме самого фильтрпресса, установка включает насосную станцию для подачи воды в резиновые диафрагмы, пульт управления фильтрпрессом и насосной станцией, поршневой насос для подачи суспензии в фильтр, центробежный насос для подачи горячей воды при промывке осадка и регенерации фильтровальной ткани. Воздух подается из заводской сети или автономным компрессором.

Эксплуатация показала, что наблюдается проскок осадка цитрата через ткань и фильтрат приходится отстаивать с целью улавливания осадка.

ПОЛУЧЕНИЕ РАСТВОРА ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ И ЕГО ОЧИСТКА

Разложение цитрата кальция

Промытый цитрат кальция, содержащий оксалат кальция (если его предварительно не выделяют), разлагают серной кислотой в реакторе из кислотоупорной стали. Реактор (расщепитель) снабжен мешалкой, паровым барботером, плотно закрывающейся крышкой и вытяжной вентиляцией. Рабочие должны быть в прорезиненных фартуках с нагрудником, резиновых сапогах, резиновых перчатках и защитных очках.

Разложение ведут по следующему режиму. Перед загрузкой цитрата в реактор подают кислые промывные воды, и суспензию тщательно размешивают. Она должна занимать не более $^2/_3$ объема реактора и иметь концентрацию 32—33 % (в расчете на без-

водный цитрат кальция), что обеспечивает получение раствора лимонной кислоты после разложения около 25 %. Температура цитратной суспензии должна быть не ниже 75 °С. Из мерника через делитель струи подают техническую серную кислоту улучшенного качества (ГОСТ 2184—67) из расчета получения ее избытка в растворе в 5—10 г/л (плотность растворов серной кислоты — см. таблицу X приложения).

Реакция разложения цитрата кальция идет по уравнению:

$$Ca_3(C_6H_5O_7)_2 + 3H_2SO_4 \rightarrow 3C_6H_8O_7 + \underline{3CaSO_4}.$$

В результате образуются лимонная кислота и труднорастворимый гипс. Ввиду экзотермичности процесса температура реакционной массы повышается примерно до 90 °С и на таком уровне ее поддерживают до начала фильтрования. Оксалат кальция при этом не разлагается и осаждается вместе с гипсом. Раствор лимонной кислоты имеет pH ~ 1,5.

Через 30—40 мин от начала разложения цитрата также при работающей мешалке проводят осаждение ионов трехвалентного железа раствором гексацианоферроата кальция или калия:

$$2Fe_2(C_6H_5O_7)_2 + 3Ca_2[Fe(CN)_6] + 6H_2SO_4 \rightarrow 4C_6H_8O_7 +$$
$$+ \underline{Fe_4[Fe(CN)_6]_3} + 6\underline{CaSO_4};$$

$$2Fe_2(C_6H_5O_7)_2 + 3K_4[Fe(CN)_6] \rightarrow 4K_3C_6H_5O_7 + \underline{Fe_4[Fe(CN)_6]_3}.$$

Раствор гексацианоферроата концентрацией около 10 % готовят в отдельной емкости и подают в реактор через мерник в течение 5—8 мин до полного осаждения железа.

Полноту осаждения железа контролируют следующим образом. Перед анализом окраску фильтрованного раствора сравнивают с окраской стандартного раствора хлорида железа (0,13 г железа в 1 л). При интенсивной окраске анализируемого раствора его обрабатывают активным углем для выравнивания окрасок. Затем в одну из пробирок с 10 мл анализируемого раствора прибавляют 1 мл 0,1 %-ного раствора гексацианоферроата, три капли концентрированной азотной кислоты и нагревают до кипения. В другую такую же пробирку с с 10 мл стандартного раствора хлорида железа добавляют также 1 мл 0,1 %-ного раствора гексацианоферроата и сравнивают окраски. При полном осаждении железа окраска жидкости в обеих пробирках одинакова.

Если после нагревания в пробирке с анализируемым раствором выпадает осадок берлинской лазури, значит в нем больше железа, чем в стандартном растворе. В этом случае добавляют гексацианоферроат. Если от прибавления гексоцианоферроата к анализируемому раствору осадок берлинской лазури не выпадает, пробу проверяют на избыток ионов $Fe(CN)_6^{4-}$, добавляя к ней несколько капель 5 %-ного раствора сульфата меди. При избытке $Fe(CN)_6^{4-}$ выпадает осадок в виде бурых хлопьев. В этом случае добавляют загрязненный железом маточный раствор и снова берут пробы.

При разделении процессов разложения цитрата и осветления раствора лимонной кислоты в реактор добавляют отработавший активный уголь. Осаждают тяжелые металлы и мышьяк сульфидом бария (0,10—0,15 кг на каждые 100 кг лимонной кислоты в растворе). В кислой среде образуется сульфид водорода, который и вступает в реакцию:

$$PbSO_4 + H_2S \rightarrow \underline{PbS} + H_2SO_4;$$

$$2As(OH)_3 + 3H_2S \rightarrow \underline{As_2S_3} + 6H_2O.$$

Полноту осаждения мышьяка проверяют пробой с $AgNO_3$ (в отфильтрованном растворе при добавлении $AgNO_3$ не должен выпадать желтый осадок Ag_3AsO_3). Через 5 мин после подачи сульфида бария избыток серной кислоты нейтрализуют суспензией цитрата.

Для определения полноты разложения цитрата кальция в две одинаковые пробирки помещают по 2—3 мл раствора и испытывают в одной на содержание кальция с 20 %-ным раствором серной кислоты, в другой — свободной серной кислоты с 20 %-ным раствором хлорида кальция (оба реактива добавляют в объемах, равных объему проб). Если в обеих пробирках после кипячения и охлаждения осадок не выпал, в них добавляют этиловый спирт-ректификат в объемах, равных содержимому пробирок Разложение цитрата кальция и нейтрализацию избытка серной кислоты считают законченными, когда в обеих пробирках без добавления спирта осадок не выпал, а со спиртом наблюдается слабое одинаковое помутнение, вызываемое малорастворимым в воде и нерастворимым в спирте гипсом.

Приведенный режим разложения цитрата кальция серной кислотой основывается на следующих положениях. Известно, что равновесной формой сульфата кальция при температурах 40—90 °С является бигидрат $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ (гипс), однако в соответствии с правилом ступеней В. Оствальда кристаллизация начинается с выделения метастабильного полуводного сульфата ($CaSO_4 \cdot 0,5H_2O$), который постепенно гидратируется, образуя бигидрат.

Гидратация полностью заканчивается за 30—40 мин и может быть ускорена повышением температуры до 90 °С и добавлением затравки из кристаллов гипса [37]. Образование кристаллов гипса идет при растворении кристаллов полуводного сульфата с получением микрогомогенного пересыщенного раствора, структурной перестройки его с образованием коагуляционной микрогетерогенной системы, образованием кристаллической структуры $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ и ростом кристаллов гипса. При температуре 80 °С и избытке серной кислоты в 20 % наибольшая величина их ($r_{ср} \cdot 10^3 \cong 11$ мм) достигается за 50—60 мин после добавления кислоты. Избыток серной кислоты нейтрализуют цитратом кальция.

Если к насыщенному раствору электролита прилить раствор другого электролита, содержащего общий (одноименный) ион, то произведение концентраций ионов превысит величину произведения растворимости, раствор становится пересыщенным и выделяет избыток растворенного вещества в виде осадка. Таким образом, уменьшение растворимости гипса в присутствии небольшого избытка серной кислоты и наблюдаемое ускорение кристаллизации вполне объяснимо, находится в полном согласии с правилом произведения растворимости. На рис. 34 приведена растворимость гипса в растворах лимонной кислоты при различных температурах и в присутствии серной кислоты [113].

Осаждение железа гексацианоферроатом в конце созревания кристаллов гипса вполне обосновано, так как иначе это затормозит рост кристаллов (из-за адсорбции берлинской лазури на сульфате кальция). Желательно пользоваться не гексациано-

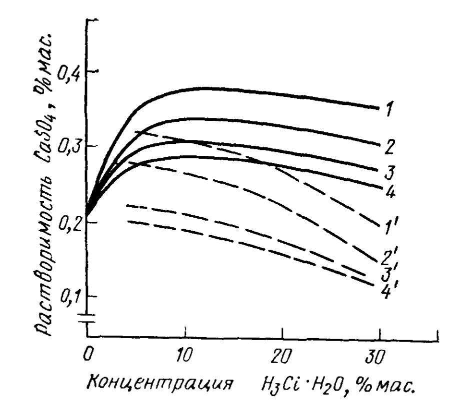


Рис. 34. Растворимость сульфата кальция в растворах лимонной кислоты при температурах (°С):
1 — 80; *2* — 60; *3* — 40; *4* — 25; *1'*—*4'* — при тех же температурах в присутствии 0,5 % серной кислоты.

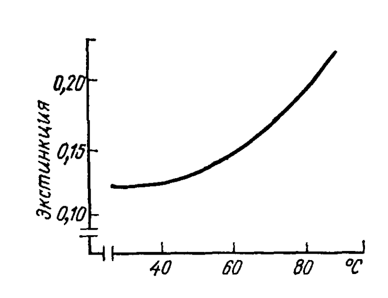


Рис. 35. Интенсивность окраски раствора лимонной кислоты в зависимости от температуры разложения цитрата кальция.

ферроатом калия, а его кальциевой солью (синькальций), поскольку при этом лимонная кислота не образует растворимой калиевой соли, увеличивающей содержание минеральных веществ в растворах лимонной кислоты (в конечном счете повышающих содержание лимонной кислоты в маточниках).

При очистке растворов лимонной кислоты ионитами тяжелые металлы и мышьяк не осаждают. Чтобы снизить потери лимонной кислоты от разложения, не допустить нарастания легкообугливаемых веществ и сильного увеличения окраски лимонной кислоты (рис. 35 [113]), на некоторых зарубежных заводах разлагают цитрат при температуре не выше 60 °С серной кислотой концентрацией 66 %. Избыток серной кислоты снижают до 1—2 г/л. Разложение ведут с затравкой (кристаллы гипса от предыдущего разложения). Процесс разложения цитрата и созревания кристаллов гипса длится примерно 2,5 ч, в том числе созревание 1 ч.

Отделение гипса

Горячая реакционная масса (гипсовая суспензия с примесями) обычно передается на вакуумные нутч-фильтры или ленточные вакуум-фильтры. Отделение гипса на нутч-фильтрах ведут примерно так же, как цитрата кальция, с кассетной или вакуумной выгрузкой осадка.

В ленточном фильтре (рис. 36) бесконечная рифленая резиновая лента с прорезями, покрытая фильтровальной тканью, надета на два барабана. Лента вместе с тканью перемещается с помощью приводного барабана и поддерживается в рабочем состоянии натяжным барабаном и роликами. В верхней части края ленты

скользят по двум параллельным опорным планкам, а под верхним участком ее расположена длинная камера. Эта камера верхними фланцами примыкает к нижней поверхности ленты и разделена поперечными перегородками на несколько секций, соединенных штуцерами с вакуум-коллекторами для раздельного сбора фильтрата и промывной жидкости. Осадок сбрасывается в месте перегиба ленты под силой собственной тяжести, а лента омывается водой из форсунок.

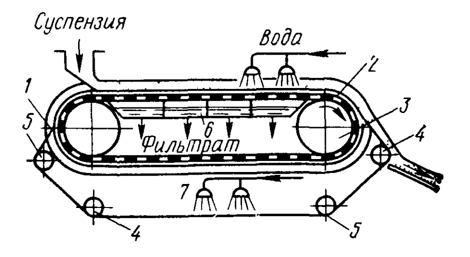


Рис 36 Ленточный вакуум-фильтр (схема)

1 — фильтрующая ткань, *2* — резиновая лента *3* — барабан, *4* и *5* — ролики, *6* — вакуум камеры, *7* — форсунки

Гипс промывают водой температурой около 90 °С до тех пор, пока содержание лимонной кислоты в промывной жидкости не снизится до 0,1 %. Слишком много воды на промывку не расходуют, так как промывную жидкость потом приходится выпаривать (увеличивается расход пара). Обычно расходуют 7—8 м³ воды на 1 т лимонной кислоты в растворе. Средняя концентрация раствора лимонной кислоты вместе с промывными жидкостями должна быть не ниже 16 %.

Берлинская лазурь, образующаяся при осаждении железа гексацианоферроатом калия, присутствует в растворе в виде стойкого золя. Она частично адсорбируется кристаллами гипса, частично коагулирует, оставаясь при фильтровании в осадке гипса. Так как в реактор вводят еще отработавший или свежий активный уголь, то осадок гипса приобретает серо-голубой цвет. Небольшая часть берлинской лазури иногда проникает и в раствор лимонной кислоты, так как она проходит даже через поры фильтровальной бумаги.

Первое выпаривание растворов лимонной кислоты

Раствор лимонной кислоты после выделения гипса направляют на первое выпаривание, а затем осветляют активным углем. Если проводится очистка на ионитах, то осветление активным углем предшествует ей. Выпаривание проводят в вакуум-выпарных аппаратах различных конструкций — горизонтальных и с выносной поверхностью нагрева сист. УкрНИИхиммаша и других, различающихся некоторыми деталями.

Аппарат с выносной поверхностью нагрева (рис. 37) состоит из кипятильника *1* и сепаратора *2*, выполненных из кислотоупорной стали. Кипятильник представляет собой трубчатку. Подлежащий выпариванию раствор поступает в трубное пространство, пар — в межтрубное и, отдав скрытую теплоту испарения, в виде конденсата отводится конденсатоотводчиком. Раствор нагревается

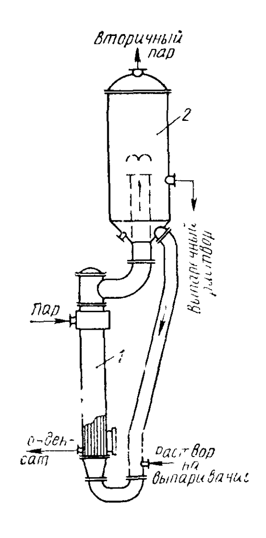


Рис. 37. Выпарной вакуум-аппарат с выносной поверхностью нагрева (схема).

в трубках до кипения, превращаясь в парожидкостную эмульсию, которая выбрасывается в сепаратор (пароотделитель) и снова возвращается в кипятильник, циркулируя между ними до тех пор, пока концентрация выпаренного раствора не будет равна заданной.

Выпаренный раствор отводят из сепаратора при непрерывном выпаривании в нескольких последовательно соединенных аппаратах, при периодическом выпаривании — из нижней части циркуляционной трубы.

Вторичный пар из сепаратора направляют в полочный барометрический конденсатор, где он конденсируется холодной водой, создавая разрежение в аппарате. Конденсатор в нижней части оборудован барометрической трубой, высота которой несколько больше высоты столба воды, необходимого для создания затвора, соответствующего разрежению в аппарате, и придания воде кинетической энергии. Нижний конец барометрической трубы опущен в барометрический ящик с постоянным уровнем воды, которая непрерывно поступает из конденсатора и непрерывно отводится центробежным насосом. Неконденсирующиеся газы из конденсатора через осушающую ловушку отводятся вакуум-насосом и выбрасываются в атмосферу. Вода из ловушки присоединяется к воде в барометрической трубе.

На отдельных заводах с целью получения конденсата пара и при невозможности использовать барометрическую воду для питания паровых котлов и в других производственных направлениях установлены поверхностные конденсаторы (кожухотрубные теплообменники), в которых пар вступает в контакт с охлаждаемой поверхностью и не смешивается с водой.

Первое выпаривание раствора лимонной кислоты можно вести непрерывно, например, в двух вакуум-аппаратах, соединенных последовательно, при использовании в качестве теплоносителя вторичного пара из первого аппарата во втором, что позволит значительно сократить расход свежего пара. Однако по старой традиции, идущей от небольшой мощности предприятий, а также в связи с отложением гипса на поверхности нагрева, несколько осложняющим переход на непрерывный процесс, ведут периодическое выпаривание в однокорпусном аппарате в течение 4—6 ч и дольше при удельном расходе пара 1,1 кг на 1 кг испаренной воды.

Растворы лимонной кислоты выпаривают до плотности 1,26—1,28 (в среднем 690 г безводной кислоты в 1 л) под разрежением около 80 кПа. Плотность определяют денсиметром при темпера-

туре 60 °С, но можно пользоваться и рефрактометром (см. табл. XI и XII приложения — коэффициенты рефракции, концентрация лимонной кислоты выражена в виде моногидрата). Выпаривание ведут с подливами раствора лимонной кислоты небольшими порциями. Понижать разрежение не следует, так как при этом повышается температура кипения раствора и увеличивается его цветность. При снижении или полном падении разрежения в системе необходимо отключить пар, иначе раствор перегреется и при дальнейшем повышении разрежения произойдет бурное самоиспарение и переброс упариваемого раствора в барометрический конденсатор. Если раствор сильно пенится, добавляют небольшое количество пеногасителя (3—5 мл). Нельзя открывать вентили на сливной линии до выравнивания давления в аппарате с атмосферным.

Для того чтобы окраска раствора лимонной кислоты не сильно нарастала, выпаривание можно вести с добавлением части активного угля, предназначенного для осветления раствора.

В процессе выпаривания растворов лимонной кислоты выпадает гипс, который не только загрязняет растворы, но и откладывается на поверхности нагрева, снижая коэффициент ее теплоотдачи. В аппаратах с выносной поверхностью нагрева, в которых происходит более быстрая циркуляция, выпадает меньше осадка, но и в этом случае поверхность нагрева приходится чистить довольно часто. Состав накипи в выпарных аппаратах двух заводов, один из которых (Белгородский) очищает раствор лимонной кислоты ионитами и редко проводит удаление осадка, приведен ниже [58]. Осадки сильно различаются по химическому составу. На Белгородском заводе, например, в накипи много кремниевой кислоты, мало кальция, отсутствуют сульфат-ионы, почти весь кальций в ней связан с лимонной кислотой.

Химический состав накипи (%)

	Выборгский завод	Белгородский завод
Влажность	4,80	5,40
Потери при прокаливании	26,39	33,82
Органические вещества	21,59	28,42
В том числе лимонная кислота	8,31	15,26
Зола	73,61	66,18
В том числе		
SiO_2	1,98	57,76
R_2O_3	4,95	1,55
CaO	27,92	6,12
SO_3	37,63	0,00
P_2O_5	1,50	1,00

Накипь удаляют механическим или химическим способами. По одному из способов [58] выпарной аппарат заливают свежей водой и кипятят 2—3 ч, затем воду спускают, заполняют 17%-ным раствором каустической соды и выдерживают 24 ч. Затем раствор спускают, промывают водой, снова кипятят с 1,5—2%-ным рас-

твором соляной кислоты в течение 3—4 ч, раствор спускают и аппарат промывают горячей водой. При этом до 80 % накипи растворяется, а остальная часть отделяется от поверхности нагрева. При большом содержании кремниевой кислоты и отсутствии сульфатов в накипи щелочная обработка не требуется, а к раствору соляной кислоты целесообразно добавить кислый фторид натрия из расчета 300 г на 100 г кремниевой кислоты.

Известны способы ослабления или устранения отложения гипса на поверхности нагрева добавлением в выпариваемый раствор мелких кристалликов гипса, являющихся центрами кристаллизации; применением ультразвуковых колебаний, которые вызывают в накипи бо́льшие колебания, чем в поверхности нагрева, вследствие чего связь между ними расшатывается; наложением магнитного поля; приданием слабого электрического заряда теплообменной поверхности, одноименного с электрокинетическим потенциалом гипса, и другие способы, не нашедшие пока реализации.

Осветление растворов лимонной кислоты активным углем

Раствор лимонной кислоты после первого выпаривания сливают в реактор, снабженный паровым барботером, мешалкой и вытяжной вентиляцией. Сначала проверяют, не содержится ли в растворе избытка серной кислоты или цитрата кальция. Обычно при упаривании появляется некоторый избыток серной кислоты, которую нейтрализуют мелом. Затем раствор нагревают до 70 °С и добавляют активный уголь в количестве 1,5—2 % к лимонной кислоте в растворе. Массу перемешивают в течение 30—35 мин и направляют на рамный фильтрпресс для отделения угля и гипса, выпавшего при выпаривании раствора.

Первые мутные порции раствора возвращают в тот же реактор. По окончании фильтрования осадок на фильтре продувают сжатым воздухом. При перезарядке фильтра осадок выгружают в сборник с мешалкой, добавляют немного воды и насосом перекачивают в реактор, предназначенный для разложения цитрата кальция серной кислотой.

Фильтрпресс (рис. 38) состоит из чередующихся плит *2* и рам *3* размером 820×820 или 1000×1000 мм. В одном фильтрпрессе от 22 до 42 рам толщиной 25—46 мм. Плиты и рамы опираются боковыми ручками на два параллельных круглых бруса *4*. На каждую плиту надевают фильтрующую ткань (салфетку) такого размера, чтобы она покрывала плиту с двух сторон. Рамы и плиты прижимаются к лобо-

Рис. 38. Рамный фильтрпресс (схема)

вине *1* при помощи подвижной лобовины *5*, на которую действует давление плунжера гидравлического устройства *6*. Воду в него подают из гидравлического аккумулятора или непосредственно из гидравлического насоса под давлением до 10 МПа.

Плита имеет рифленую поверхность с желобками. Во всех рамах и плитах имеются приливы *7* с отверстиями. При сборке фильтрпресса эти приливы соединяются и из них образуется сплошной канал. Через отверстия в рамах он сообщается с их внутренней полостью, в которую подается суспензия под давлением сначала небольшим, а затем до 0,2—0,3 МПа.

Светлый раствор через ткань и образовавшийся слой осадка проникает в плиты, стекает по рифлям вниз с обеих сторон плит и через штуцеры *8* покидает фильтрпресс, направляясь по желобу в сборник перед вторым выпариванием. Осадок собирается в рамах и заполняет их. При разборке фильтрпресса отодвигают подвижную лобовину, рамы и плиты раздвигают. Осадок разгружают в бункер, установленный под фильтрпрессом. Фильтрпрессы имеют большую поверхность фильтрования на единице площади, просты и удобны в эксплуатации, но трудоемки в обслуживании.

Осветление растворов лимонной кислоты активными углями основано на явлении адсорбции, которая количественно описывается уравнением Фрейндлиха. Эффект обесцвечивания определяется отношением разности между начальной и конечной цветностями к начальной и выражается в процентах. При прочих равных условиях он возрастает при одинаковой дозе угля с увеличением начальной цветности и при одинаковой начальной цветности с увеличением дозы угля. Расход угля устанавливается на основании опытных данных и изотермы Фрейндлиха. Установление адсорбционного равновесия требует определенного времени и ускоряется с повышением температуры.

Активный уголь — пористый сорбент, получаемый карбонизацией углеродистого материала с последующей активацией угля-сырца водяным паром при температуре 800—900 °С и тонким измельчением. В табл. 26 дана характеристика древесных осветляющих (порошкообразных) углей. Уголь ОУ-А сухой щелочной, ОУ-Б — влажный кислый, ОУ-В — сухой щелочной, ОУ-Г — сухой щелочной.

С технической точки зрения удобнее пропускать осветляемый раствор через слой зернистого адсорбента, чем смешивать отдельные порции раствора с адсорбентом и затем разделять их фильтрованием. Такой сорбент легче поддается регенерации и на осветлении растворов может быть использован многократно с меньшим удельным расходом.

Обычно используют гранулированные активные угли, получаемые из каменного угля, полукокса и торфа. Последние дробят, измельчают на шаровой мельнице, смешивают с древесной смолой и образующуюся пластическую массу продавливают через фильеры. Затем ее разрезают на гранулы, сушат и обжигают во вращающейся печи с активацией водяным паром и газом. Варьирование условий получения активного угля позволяет «конструировать» адсорбент с заданными свойствами.

Зернистая структура угля определяет и иные технические приемы его использования. Уголь загружают в одну или две колонны, соединенные последо-

Таблица 26

Характеристика осветляющих углей

Показатели	Нормы для марок			
	ОУ-А	ОУ-Б	ОУ-В	ОУ-Г
Внешний вид	Тонкодисперсный порошок черного цвета, не содержащий посторонних включений			
Адсорбционная активность по метиленовому голубому, мг/г, не менее	225	210	Не нормируется	
Адсорбционная активность по мелассе, %, не менее	100	100	75	50
Зольность, %, не более	10	6	10	10
Содержание влаги, %, не более	10	58	10	10
Содержание водорастворимой золы, %, не более	2	1	2	2
pH водной вытяжки	Не нормируется	4—6	Не нормируется	
Степень измельчения (остаток на сетке 01), %, не более	5	—	5	5
Содержание соединений железа в пересчете на Fe, %, не более	0,2	0,2	0,2	0,2
Содержание водорастворимых соединений железа	Отсутствие			

вательно. Осветляемый раствор подают в колонну снизу вверх. Часть отработавшего угля выводят снизу колонны для регенерации и такую же часть свежего угля засыпают сверху (работа с подвижным слоем угля). Принцип противотока обеспечивает наиболее эффективное использование угля.

Использование гранулированного угля имеет и свои недостатки: разбавление растворов лимонной кислоты, сложность периодической загрузки, догрузки и выгрузки угля из колонн (фильтров), периодичность действия и необходимость регенерации угля с затратой значительных средств. Адсорбция красящих веществ в гранулах происходит медленнее, так как медленно идет диффузия в капиллярах. Из-за тесного соприкосновения частиц угля не вся его поверхность участвует в контакте с раствором.

Наиболее эффективна термическая регенерация угля при температуре около 800 °С, но она связана с необходимостью выгрузки угля из колонн и повторной загрузки после регенерации. При химической регенерации (окислителями) уголь не надо выгружать из колонны.

Очистка растворов лимонной кислоты ионитами

Реакционную массу после разложения цитрата кальция без осаждения ионов железа и мышьяка фильтруют, раствор лимонной кислоты осветляют активным углем, вновь фильтруют на фильтрпрессах и на мешочных фильтрах типа Прокша, охлаждают в теплообменнике до 40—45 °С и направляют на ионитную установку. Ионы железа и мышьяка вместе с оксидом кальция и другими ионами выделяют на ионообменниках. Осветляющий активный уголь адсорбирует красящие вещества, не затрагивая в основном минеральных веществ, удаляемых на ионитах.

Снижение цветности и тщательное фильтрование растворов необходимы, так как красящие вещества также сорбируются ионитами, взвешенные вещества засоряют их, и в том и в другом случае снижая обменную емкость.

После ионообмена в катионитовых и анионитовых реакторах раствор фильтруют на контрольных фильтрах (с целью улавливания унесенных мельчайших частичек анионита) и упаривают в один прием в двухкорпусном вакуум-выпарном аппарате.

Реактор (фильтр) представляет собой цилиндрическую емкость высотой 6 м, диаметром 1,5 м, с крышкой и съемным днищем, изготовленную из углеродистой стали, гуммированную изнутри пищевой резиной ИР-23а или ИР-106 и рассчитанную на рабочее давление 0,6 МПа. В нижней части реактора расположена дренажная система из колпачков. В катионитовых фильтрах на колпачки загружают слой фарфоровой насадки высотой 10 см, а на него — слой кварцевого песка высотой 20 см. В анионитовые реакторы загружают только кварцевый песок слоем 30 см, затем загружают иониты слоем, равным $^2/_3$ полезной высоты цилиндрической части реактора, отношение числа катионитовых реакторов к анионитовым 3 : 2.

Все трубопроводы, вентили, сборники, насосы выполняют из кислотоупорных материалов, стали, гуммированной пищевой резиной, или эмалированными.

Используют катионит КУ-2-8-чС в Н-форме и анионит АВ-16ГС в ОН-форме. Катиониты — высокомолекулярные органические соединения (твердые гели), содержащие ионогенные активные группы сильно кислотного характера, способные к реакциям катионного обмена, например, с ионом кальция:

$$2K \cdot H^+ + Ca^{2+} \mid SO_4^{2-} \rightleftarrows K_2 \cdot Ca^{2+} + H_2^+ \mid SO_4^{2-}.$$

Катиониты нерастворимы в воде, растворах минеральных кислот, щелочей и в органических растворителях. Катионит КУ-2-8ч-С получают полимеризацией стирола с дивинилбензолом с последующей обработкой набухшего сополимера хлорсульфоновой кислотой. Ионогенной является сульфогруппа.

Главный показатель качества ионитов — обменная емкость, которая выражается числом мг-экв в 1 мл набухшего ионита. Различают полную статическую, равновесную статическую и динамическую емкости. Первая соответствует максимально возможному насыщению ионита удаляемыми катионами или анионами в статических условиях, последняя — практически целесообразному насыщению, в динамических условиях после которого ионообменная способность ионита резко падает.

Катионит КУ-2-8-чС (ГОСТ 20298—74) представляет собой сферические зерна от желтого до коричневого цвета, размером 0,40—1,25 мм, содержащие 50—60 % влаги, имеющие удельный объем в Н-форме не более 3 см³/г, полную статическую обменную емкость не менее 1,65 мг-экв/мл, равновесную статическую обмен-

ную емкость не менее 1,5 мг-экв/мл и динамическую обменную емкость (с полной регенерацией ионита) не менее 1300 г-экв/м³.

Анионит АВ-16ГС — сильно основной, получается поликонденсацией пиридина, полиэтилена, полиамина и эпихлоргидрина. Ионогенными являются вторичные и третичные алифатические аминогруппы и пиридиновые группы. При обмене анионов происходит, например, следующая реакция:

$$2A\cdot OH^- + H_2^+ \mid SO_4^{2-} \rightleftharpoons A_2\cdot SO_4^{2+} + 2H_2O.$$

Таким образом при катионитово-анионитовом обмене из раствора удаляются, например, ионы Ca^{2+} и SO_4^{2-} и образуется вода.

Согласно ГОСТ 20301—74, этот анионит представляет собой сферические зерна желто-коричневого цвета, размером 0,4—1,6 мм, содержащие влаги 60—65 %, имеющие удельный объем в ОН-форме $4{,}4\pm0{,}4$ см³/г, полную статическую обменную емкость не менее 1,70 мг-экв/мл и осветляющую способность не менее 85 %.

Гарантированный срок хранения ионитов — 12 мес со дня их изготовления.

Реакция ионообмена — гетерогенная, обратимая и подчиняется закону действия масс. По абсорбируемости катионы и анионы располагаются в ряды:

$$Li^+,\ Na^+,\ K^+,\ NH_4^+,\ Mg^{2+},\ Ca^{2+},\ Ba^{2+},\ Al^{3+},\ Fe^{3+}\ \ldots H^+;$$

$$0{,}5SO_4^{2-},\ Cl^-,\ Br^-,\ CNS^-\ \ldots OH^-.$$

При равной концентрации в растворе ионы, стоящие правее, вытесняют из соответствующего ионита ионы, стоящие левее.

Когда ионообменная способность будет исчерпана, катионит и анионит регенерируют — вытесняют сорбированный ион соответственно кислотой (H^+) и щелочью (OH^-). Чтобы вытеснить, например, из катионита катион, стоящий в ряду левее, концентрация катиона, стоящего правее, должна быть в два-три раза больше, чем концентрация вытесняемого иона в выходящем растворе.

Регенерацию катионита ведут раствором соляной кислоты. При использовании ее следует учитывать большую агрессивность и возможность загрязнения растворов лимонной кислоты хлоридами. Азотную кислоту не применяют потому, что она является сильным окислителем, способствующим разрушению катионита. Серная кислота опасна возможностью образования в фазе катионита трудно растворимого осадка сульфата кальция.

Контроль очистки ведут по проскоку из катионообменника иона железа, из анионообменника — сульфат-иона в обработанный раствор. Учитывая, что растворимость лимонной кислоты увеличивается главным образом щелочными солями калия и натрия (см. с. 178), целесообразно контролировать работу катионитовой установки по проскоку этих катионов, а не катионов железа, которые вытесняют другие катионы из катионообменной смолы.

Ионообменная обработка растворов лимонной кислоты не счи-

тается обязательной. При необходимости получения кристаллов с меньшим содержанием примесей проводят перекристаллизацию, являющуюся также мощным фактором очистки.

Другие способы выделения и очистки лимонной кислоты

По способу Г. Шульца культуральную жидкость сгущают под разрежением, нейтрализуют гидроксидом калия или натрия и кристаллизуют с затравкой соответствующей соли в течение 24 ч. Оптимальная концентрация сгущенной культуральной жидкости по лимонной кислоте зависит от числа замещенных атомов водорода в кислоте и рода заместителя:

	Концентрация лимонной кислоты, %
$KH_2(C_6H_5O_7)$	58—66
$NaH_2(C_6H_5O_7)$	55—68
$Na_2H(C_6H_5O_7)$	52—62
$Na_3(C_6H_5O_7)$	65—85

Выход лимонной кислоты в виде соли составляет 50—80 % от сахара мелассы. Кристаллы соли промывают водой, промывные воды присоединяют к маточному раствору. Соль лимонной кислоты, оставшуюся в маточном растворе после выпаривания, второй и третьей кристаллизации ее, осаждают $Ca(OH)_2$ или $CaCO_3$ с $CaCl_2$. Затем цитрат кальция отфильтровывают и разлагают раствором серной кислоты. Гипс отделяют, а раствор, как и основной соли, подвергают ионитовой или электродиализной очистке.

Например, при кристаллизации однозамещенного калиевого цитрата процесс происходит по следующим реакциям:
при осаждении части лимонной кислоты из сгущенной культуральной жидкости

$$H_3(C_6H_5O_7) + KOH \rightarrow KH_2(C_6H_5O_7) + H_2O;$$

при осаждении лимонной кислоты из маточного раствора

$$KH_2(C_6H_5O_7) + Ca(OH)_2 \rightarrow KCa(C_6H_5O_7) + 2H_2O;$$

реакция разложения K—Ca-цитрата

$$KCa(C_6H_5O_7) + H_2SO_4 \rightarrow KH_2(C_6H_5O_7) + \underline{CaSO_4};$$

реакция катионообмена

$$KH_2(C_6H_5O_7) + RH \rightarrow H_3(C_6H_5O_7) + RK;$$

регенерация катионита

$$RK + H_2SO_4 \rightarrow RH + KHSO_4;$$

реакция при электродиализе

$$KH_2(C_6H_5O_7) + H_2O \rightarrow H_3(C_6H_5O_7) + KOH.$$

При кристаллизации дву- и трехзамещенного цитрата натрия или калия ионообменная очистка неэкономична, поэтому применяют электродиализ. При выделении лимонной кислоты этим методом экономятся химикаты, уменьшается количество гипсового шлама. KH_2-цитрат, K—Ca-цитрат легче фильтруются, чем трехкальциевый цитрат. Скорость фильтрования суспензии гипсового шлама в пять раз больше, чем по обычному способу. На 25 % меньше расходуется воды на промывку.

По способу Р. Айерса предполагается, что в растворе существует равновесие между смесью

$$Ca_3(C_6H_5O_7)_2 + H_3(C_6H_5O_7) \rightleftarrows 3CaH(C_6H_5O_7).$$

При получении $CaH(C_6H_5O_7)$, по сравнению со средним (трехкальциевым), имеются преимущества: на $^1/_3$ меньше расход CaO и H_2SO_4, кристаллизация его более выражена, лучше идет промывка, меньше содержится примесей (не более 4 %). Поэтому рекомендуется получать кристаллы именно этой соли.

При комнатной температуре скорость реакции в правом направлении очень мала. При температуре до 90 °C и соотношении среднего цитрата к лимонной кислоте 1 моль: 1 моль, особенно в присутствии затравки, реакция сильно ускоряется и происходит полное превращение в $CaH(C_6H_5O_7)$. Возможны варианты. По первому из них культуральную жидкость разделяют на две неравные части — на $^2/_3$ и $^1/_3$. В первой части жидкость нейтрализуют полностью и получают средний цитрат кальция, который выделяют фильтрацией и затем добавляют в $^1/_3$ исходной культуральной жидкости. При нагревании образуется осадок $CaH(C_6H_5O_7)$. По второму варианту известь добавляют в количестве $^2/_3$ от необходимого непосредственно в культуральную жидкость. При комнатной температуре образуется осадок среднего цитрата кальция, но если его нагреть, то за 2 ч с затравкой образуется $CaH(C_6H_5O_7)$. Лимонную кислоту, оставшуюся в маточных растворах, нейтрализуют до среднего цитрата кальция и перерабатывают как обычно.

По способу французской фирмы De Melle лимонную кислоту можно экстрагировать селективными органическими растворителями после разложения цитрата или сразу из культуральной жидкости и затем реэкстрагировать водой. Как экстрагирование, так и реэкстрагирование ведут в абсорберах колонного типа по принципу противотока. Перед экстрагированием удаляют мицелий. Культуральную жидкость обрабатывают серной кислотой для выделения части лимонной кислоты, находящейся в виде солей. Затем ее освобождают от щавелевой кислоты осаждением $Ca(OH)_2$ и фильтрованием. Величину pH жидкости перед экстракцией доводят до 1,6—1,8.

Органические растворители (экстрагенты), кроме высокой селективности, должны хорошо растворять оксикислоты, быть мало растворимы в воде, инертны (не взаимодействовать ни с самими оксикислотами, ни с их примесями, не полимеризоваться, не изменяться при нагревании); иметь плотность, отличающуюся от плотности растворов оксикислот; обладать летучестью, узким интервалом температуры кипения, небольшой теплоемкостью и теплотой испарения. Кроме того, они должны быть нетоксичными, недефицитными и недорогими.

В качестве растворителей предложены: декан, метилэтилкетон, циклогексанон, н-амиловый, н-гексиловый, н-бутиловый, изобутиловый и вторичный бутиловый спирты, три-н-бутилфосфат и триизобутилфосфат, н-нониловый и изонониловый спирты.

Три-н-бутилфосфат

$$\begin{array}{l} CH_3—(CH_2)_2—CH_2O \quad\quad O \\ \quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad\; \searrow P \nearrow\!\!\!\!\!/ \\ CH_3—(CH_2)_2—CH_2O \quad\quad OCH_2—(CH_2)_2—CH_3 \end{array}$$

издавна применяется в лабораторной практике. Так как он имеет очень высокую вязкость, то для снижения ее рекомендуется добавлять разбавители. Ими могут быть углеводороды типа октана или бензина, простые эфиры — бутиловый и изобутиловый, сложные эфиры типа н-бутилацетата и кетоны типа метилизобутилового. Разбавители должны обладать не только меньшей вязкостью, но и меньшей плотностью. Соотношение три-н-бутилфосфат: разбавитель в бинарной смеси в зависимости от природы разбавителя и экстрагируемой оксикислоты колеблется в широких пределах 95÷70 : 5÷30.

Метилэтилкетон хорошо растворяется в воде, поэтому для уменьшения его растворимости добавляют этиловый или изопропиловый эфир в количестве 10—50 %. Для повышения коэффициента распределения к бутанолу-2 добавляют около 15 % бутилового или изобутилового эфира.

Исследования показали [78, 81], что оксикислоты извлекаются органическими растворителями в виде комплекса, например, три-н-бутилфосфатом (ТБФ): лимонная $C_6H_8O_7 \cdot 3ТБФ \cdot 2H_2O$, винная $C_4H_6O_6 \cdot 2ТБФ \cdot 1,5\ H_2O$ и молочная $C_3H_6O_3 \cdot x ТБФ \cdot y H_2O$.

Эффективность процесса экстрагирования определяется коэффициентом распределения оксикислоты α между двумя жидкими фазами при установившемся равновесии:

$$\alpha = C_э/C_р,$$

где $C_э$ — концентрация оксикислоты в экстракте (органическом растворителе); $C_р$ — концентрация оксикислоты в рафинате (исходном растворе после экстрагирования).

Коэффициент распределения зависит от химического строения оксикислоты и растворителя, концентрации оксикислоты, соотношения растворителя и оксикислоты, температуры и способа экстрагирования. Коэффициенты α возрастают с уменьшением концентрации кислоты в исходном растворе и с увеличением соотношения органический растворитель—оксикислота и понижением температуры. Обычно соотношение органический растворитель—раствор оксикислоты находится в пределах 1:1÷3:1; температура 10—30 °C. Реэкстрагирование водой ведут при температуре 70—90 °C. При однократном экстрагировании три-н-бутилфосфатом в оптимальных условиях коэффициенты распределения составляют для лимонной кислоты, полученной ферментацией сахарных растворов, 0,27—1,59 и 0,15—0,7 — для получения ферментацией мелассных растворов; для винной кислоты из растворов различной чистоты 0,2—0,7; для молочной кислоты 0,3—1,2. Для более полного извлечения оксикислот из исходных растворов (до 95 %) экстрагирование проводят в несколько ступеней по принципу противоточного турбулентного потока жидкостей.

Экстракционный способ применительно к культуральной жидкости неоднократно проверялся. Для него характерны: низкие коэффициенты распределения лимонной кислоты между культуральной жидкостью и экстрагентом, что требует значительного объема экстрагента, больших размеров экстракторов и зданий; большая растворимость экстрагента в воде, вследствие чего велик его расход; сбросные воды имеют высокую концентрацию экстрагента и стоимость их очистки до существующих норм высока; дороговизна и дефицитность экстрагента; продукт требует тщательной очистки.

Фирма De Melle продолжает совершенствовать свой способ. В последнее время для экстракции лимонной кислоты предложены новые растворители — N-замещенные алкиламиды, содержащие более 12 атомов углерода.

Второе выпаривание раствора лимонной кислоты

Осветленные растворы подвергают второму выпариванию под разрежением около 80 кПа, концентрируя до плотности 1,37—1,38 (69—71 % мас. безводной кислоты). Затем раствор фильтруют через сито или марлю и передают в кристаллизатор.

Температуру выпаривания нельзя повышать, так как при этом увеличивается цветность растворов (рис. 39).

КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

Растворимость и теория кристаллизации

Лимонная кислота хорошо растворяется в воде. С повышением температуры растворимость ее увеличивается. Растворимость принято выражать числом килограммов лимонной кислоты, растворившейся в 1 кг воды при данной температуре, и называть коэффициентом растворимости P_0. По табл. I приложения находим, что при температуре 20 °C в 1 кг воды раство-

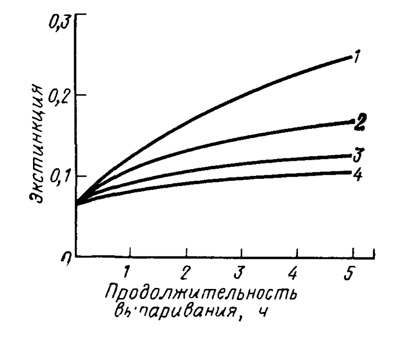


Рис. 39. Увеличение цветности растворов лимонной кислоты в зависимости от продолжительности и температуры выпаривания (°С):
1 — 105; *2* — 90; *3* — 75; *4* — 60.

ряется 1,47 кг лимонной кислоты, при 100 °С — 5,70 кг, т. е. в 3,8 раза больше. Раствор, в котором при данной температуре кристаллическая кислота больше не растворяется, называется насыщенным.

В производственных растворах лимонной кислоты содержатся различные примеси (табл. 27 [65]), увеличивающие ее растворимость.

Из других органических кислот обнаружена яблочная. Постоянно присутствует серная кислота (0,5—2,0 %).

Влияние примесей на растворимость лимонной кислоты характеризуется коэффициентом насыщения α', который выражает отношение коэффициентов растворимости кислоты в присутствии примесей — P и в чистом растворе P_0 при одной и той же температуре:

$$\alpha' = P/P_0.$$

Таблица 27

Состав минеральных примесей в производственных растворах лимонной кислоты (%)

Примеси	Основные растворы	Маточные растворы		
		первые	вторые	третьи
Зола	2,20—4,03	4,15—5,20	5,92—7,59	8,18—10,04
K_2O	1,08—2,62	1,95—2,91	3,08—3,48	3,60—5,20
Na_2O	0,38—0,55	0,90—1,15	1,43—2,50	2,60—2,85
MgO	0,06—0,10	0,08—0,41	0,16—0,44	0,19—0,49
CaO	0,04—0,14	0,04—0,14	0,05—0,16	0,07—0,20
Fe_2O_3	0,20—0,72	0,58—0,80	0,68—1,05	0,96—1,33
Al_2O_3	0,10—0,19	0,16—0,20	0,16—0,33	0,17—0,38
CuO	0,001—0,002	0,0015—0,002	0,002—0,006	0,002—0,040

Для чистых растворов $P = P_0$. Коэффициент насыщения не зависит от температуры, а зависит только от количества примесей и их характера. По мере накопления примесей в растворах растворимость лимонной кислоты повышается (рис. 40 [65]).

Как видно из табл. 27, основной минеральной примесью являются щелочные соли калия и натрия. Хотя влияние отдельных примесей на растворимость лимонной кислоты не изучалось, однако, исходя из количества их, можно считать, что решающую роль играют ионы калия и натрия. Отмечая отрицательную роль примесей на кристаллизацию лимонной кислоты, было бы целесообразно на всех стадиях производства, начиная с культуральной жидкости, систематически контролировать доброкачественность (чистоту) растворов лимонной кислоты с тем, чтобы своевременно

принимать меры к ее повышению. Это в равной мере относится и к технологии молочной и винной кислот.

Раствор, содержащий растворенной лимонной кислоты больше, чем насыщенный, называется пересыщенным. Пересыщенные растворы образуются при выпаривании воды в вакуум-выпарных аппаратах и дальнейшем охлаждении растворов. Число, показывающее, во сколько раз больше лимонной кислоты находится в пересыщенном растворе на единицу воды по сравнению с насыщенным раствором при одинаковой температуре, называется истинным коэффициентом пересыщения α

$$\alpha = P_1/P,$$

где P_1 — масса лимонной кислоты, растворенной в единице воды в пересыщенном растворе.

Рис. 40. Зависимость коэффициента насыщения растворов лимонной кислоты от содержания примесей.

Отношение $P_1 : P_0$ называют видимым коэффициентом пересыщения.

Насыщенные растворы лимонной кислоты весьма устойчивы: они не кристаллизуются. В отличие от этих стабильных растворов, даже при небольшом пересыщении лимонная кислота кристаллизуется на готовых кристаллах, но спонтанного образования новых центров кристаллизации не происходит. Такие растворы называют метастабильными (нестабильными). В растворах со значительным коэффициентом пересыщения не только растут введенные кристаллы, но и зарождаются новые. Это неустойчивые (лабильные) растворы. Движущей силой кристаллизации является разность концентраций в пересыщенном и насыщенном растворах.

Величины минимального коэффициента пересыщения, при котором возможно зарождение центров кристаллизации, и предельного, при котором сразу же начинается кристаллизация, не изучены.

На рис. 41 схематически изображены процессы выпаривания воды и кристаллизации лимонной кислоты [113]. Концентрирование раствора, например при 40 °C, идет по пути *a* до содержания в нем лимонной кислоты, близкого к насыщенному раствору. Линия *b* указывает, что при охлаждении до 20 °C концентрация его пересекает кривую растворимости, раствор становится пересыщенным, лабильным и без затравки начинается кристаллизация. При этом концентрация его снижается по пути *c* до кривой растворимости *d* (маточный раствор) и на этом уровне остается постоянной. Чтобы маточный раствор снова мог кристаллизоваться, его вновь надо упарить.

На рис. 42 приведены кривые, характеризующие кристаллизацию лимонной кислоты при одинаковой температуре и различных

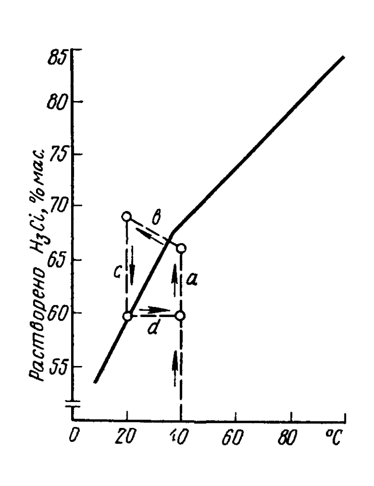


Рис. 41. Схематическое изображение выпаривания и кристаллизации в диаграмме растворимости:

а — выпаривание; *b* — охлаждение; *с* — кристаллизация; *d* — маточный раствор.

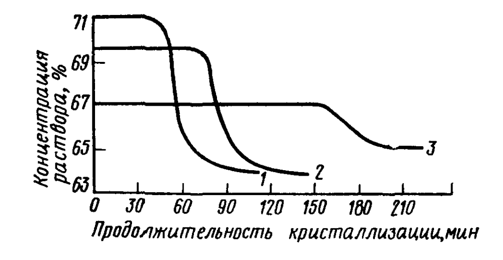


Рис. 42. Кристаллизация лимонной кислоты при температуре 30 °С и разных значениях α:

1 — 1,33; *2* — 1,22; *3* — 1,12.

значениях α [48]. На кривых видны три участка. Первый из них, соответствующий неизменной концентрации, называется индукционным, или латентным, периодом. На этом участке происходит образование центров кристаллизации, на втором — интенсивное образование и рост кристаллов, на третьем — медленное снижение концентрации раствора почти до насыщенного. Чем меньше коэффициент пересыщения, тем продолжительнее индукционный период.

Чтобы началась кристаллизация, недостаточно иметь раствор с тем или иным коэффициентом пересыщения; необходимы центры кристаллизации. Появление их может начаться спонтанно или быть вызвано искусственным путем: перемешиванием, воздействием ультразвука, затравкой кристаллов лимонной кислоты и т. д. Под центрами кристаллизации понимают такие уплотненные комплексы молекул кислоты в растворе, которые достигли при данных условиях так называемых критических размеров $r_{кр}$ и способны к устойчивому росту. Скорость образования критических зародышей зависит от температуры, коэффициента пересыщения и поверхностного натяжения на границе раздела фаз.

Если рост кристаллов возможен при любом, даже незначительном пересыщении раствора, то образование центров кристаллизации — только при определенном пересыщении, ниже которого они не образуются.

Теории, объясняющей все количественные и качественные изменения в процессе кристаллизации, не существует, но, очевидно, процесс зависит от скорости диффузии и включения кристаллизуемого вещества в кристаллизационную решетку. Представления о росте кристаллов весьма различны.

А. Н. Щукаревым была предложена диффузионная гипотеза, согласно которой кристаллизующееся вещество под действием градиента концентрации

диффундирует к граням кристалла и отлагается на них. Количество выкристаллизованного вещества пропорционально коэффициенту диффузии, площади кристалла, градиенту концентраций, времени кристаллизации и обратно пропорционально толщине прилипшего неподвижного диффузионного слоя, которым окружены растущие кристаллы. Избыток вещества из этого пересыщенного слоя очень быстро выкристаллизовывается, благодаря чему он остается ненасыщенным.

Эта гипотеза была экспериментально обоснована [6] на единичном кристалле, в частности, лимонной кислоты при небольших коэффициентах пересыщения. В дальнейшем не все ее положения были подтверждены: не было найдено различия в толщине диффузионного слоя на разных гранях, константа скорости растворения кислоты в воде оказалась больше константы скорости роста кристалла кислоты (по диффузионной теории они должны быть равны) и т. д.

Обращалось внимание на силы притяжения кристаллизующихся молекул между раствором и кристаллической решеткой, которую исследовал Р. Картье на растворах лимонной и итаконовой кислот. Наблюдаемый послойный рост кристаллов послужил М. Фольмеру основой для создания теории, которая базируется на термодинамических взглядах Д. Гиббса, впервые высказавшего предположение о скачкообразном росте кристаллов. Новейшие гипотезы строятся на атомно-молекулярных свойствах веществ.

Форма (габитус) кристаллов лимонной кислоты в данных условиях строго повторяется, образуя соответствующую кристаллическую решетку; она закодирована.

При кристаллизации в больших объемах (массовой кристаллизации) условия будут отличаться от условий кристаллизации единичного кристалла, поэтому результаты такой кристаллизации являются некоторыми средними величинами.

Кинетика кристаллизации лимонной кислоты

Продолжительность кристаллизации складывается из длительности индукционного периода и длительности роста кристаллов.

Продолжительность индукционного периода выражается зависимостью вида [48]

$$\lg \tau_1 = A - B \lg \alpha,$$

где A и B — постоянные.

При кристаллизации из чистых и очищенных ионитами растворов значения $A=2{,}536$ и $B=8{,}990$; из неочищенных $A=2{,}315$ и $B=4{,}802$. В неочищенных растворах продолжительность индукционного периода возрастает.

Введение затравки кристаллов значительно сокращает продолжительность индукционного периода (при температуре 30 °C):

для чистых растворов

$$\lg \tau_1 = 2{,}406 - 11{,}99 \lg \alpha;$$

для неочищенных растворов

$$\lg \tau_1 = 2{,}055 - 4{,}076 \lg \alpha.$$

Продолжительность индукционного периода при частоте вращения мешалки от 60 до 240 об/мин сокращается в 1,6—2 раза. Зависимость продолжительности индукционного периода от частоты вращения ограничена 60 об/мин.

Скорость процесса кристаллизации лимонной кислоты, как и других веществ, подчиняется кинетическому уравнению первого порядка:

$$x = C_0(1 - e^{-K\tau}),$$

где x — количество выкристаллизовавшейся лимонной кислоты за время τ; C_0 — начальная концентрация раствора, % мас.; К — константа скорости кристаллизации τ^{-1}; τ — продолжительность кристаллизации, мин.

Количество лимонной кислоты, оставшейся за время τ в растворе:

$$C_0 - x = ae^{-K\tau}.$$

Из уравнения $\ln C_0 - \ln(C_0 - \bar{x}) = K\tau$

$$K = \frac{1}{\tau}\ln\frac{C_0}{C_0 - x}.$$

Изучено влияние основных факторов на константу скорости кристаллизации лимонной кислоты [48]. Зависимость кинетической константы кристаллизации от чистоты растворов и начального коэффициента пересыщения при температуре 30 °С приведена в табл. 28.

Таблица 28

Величина константы скорости кристаллизации $K \cdot 10^4$, мин$^{-1}$

α	Растворы		α	Растворы	
	очищенные	неочищенные		очищенные	неочищенные
1,37	147	76	1,20	25	15
1,35	105	65	1,15	15	8
1,30	62	45	1,10	8	5
1,25	38	25	1,07	5	2,8

Эта константа сильно возрастает с повышением коэффициента пересыщения. В присутствии примесей она в 1,5—2 раза меньше, что, по-видимому, объясняется адсорбцией примесей на гранях кристаллов и увеличением вязкости растворов.

Зависимость продолжительности кристаллизации лимонной кислоты (мин):

из очищенных растворов

$$\tau = 28{,}58 - 155{,}97 \lg\alpha;$$

из неочищенных растворов

$$\tau = 34{,}18 - 165{,}44 \lg\alpha.$$

Кинетическая константа кристаллизации гидратной и ангидридной лимонной кислоты по-разному зависит от температуры (табл. 29, раствор очищенный, $\alpha = 1{,}17$). В первом случае с по-

Скорость кристаллизации лимонной кислоты в зависимости от температуры

Температура, °C	Продолжительность, мин	$K \cdot 10^4$, мин$^{-1}$	Температура, °C	Продолжительность, мин	$K \cdot 10^4$, мин$^{-1}$
20	25	10,3	40	8	32,7
25	21	18,2	45	10	18,4
30	15	20,0	50	24	9,8
35	8	36,0	55	28	7,4

вышением температуры на 10 °C она возрастает примерно в 2 раза, во втором — уменьшается в 2,4 раза.

Энергия активации, вычисленная по уравнению Аррениуса, для скорости кристаллизации гидратной лимонной кислоты находится в пределах 31 540—62 800 кДж/моль. Высокие значения энергии активации позволяют предположить, что скорость роста кристаллов лимонной кислоты определяется поверхностной реакцией по Р. Картье [48].

По опытным данным выведены эмпирические уравнения зависимости констант скорости кристаллизации от температуры для различных начальных пересыщений:

$$\text{при} \quad \alpha = 1{,}16 \quad \ln K = 18{,}727 - 7625/T;$$
$$\text{при} \quad \alpha = 1{,}17 \quad \ln K = 15{,}795 - 6625/T;$$
$$\text{при} \quad \alpha = 1{,}20 \quad \ln K = 7{,}40 - 4000/T;$$
$$\text{при} \quad \alpha = 1{,}36 \quad \ln K = 7{,}550 - 3800/T.$$

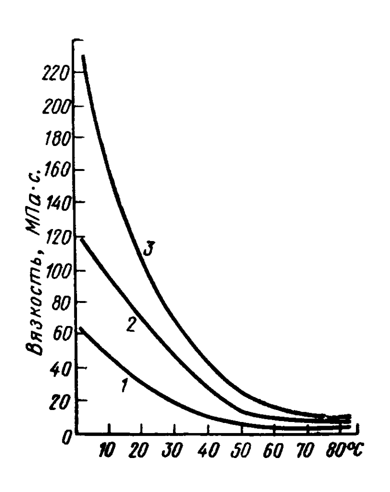


Рис 43. Вязкость маточного раствора утфелей в зависимости от температуры:
1 — первого; 2 — второго; 3 — третьего.

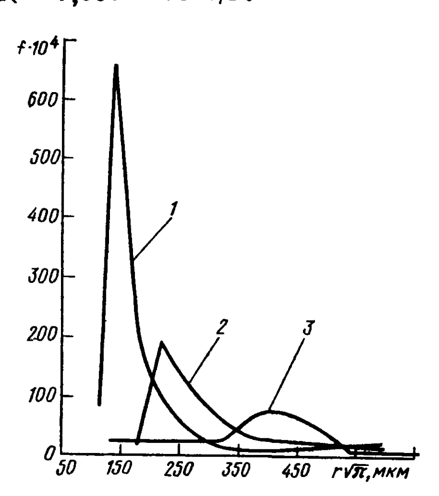


Рис. 44. Распределение кристаллов по размерам в зависимости от начального пересыщения при α:
1 — 1,36; 2 — 1,17; 3 — 1,07.

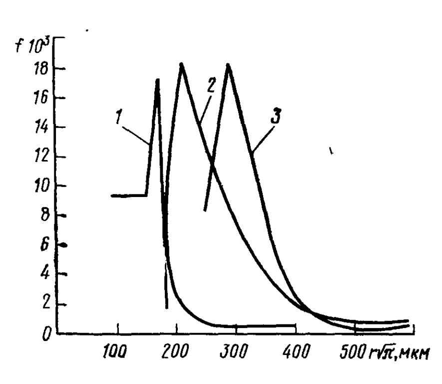


Рис. 45. Распределение кристаллов по размерам в зависимости от температуры (°С):
1 — 20; 2 — 30; 3 — 35.

Скорость кристаллизации зависит и от вязкости раствора. Она уменьшается с повышением температуры, а с ней уменьшаются вязкость и толщина неподвижного вокруг кристаллов диффузионного слоя, вследствие чего кристаллизация ускоряется. Вязкости маточных растворов при концентрации сухих веществ в них около 70 % в зависимости от температуры показаны на рис. 43 [65], они не очень большие, но возрастают по мере увеличения содержания примесей. Вязкость утфелей при температуре около 20 °С и концентрации кислоты 70 % мас. составляла (в МПа·с) соответственно: I кристаллизации 170, II кристаллизации 420, III кристаллизации 470. При такой вязкости утфели достаточно текучи и легко центрифугируются.

Распределение образовавшихся кристаллов по размерам зависит от коэффициента пересыщения и температуры [48]. Плотность распределения по Михневичу равнялась $f=\Delta N/(N\Delta r)$, где ΔN — число кристаллов с размерами (в мкм) от r до Δr; N — общее число измеренных кристаллов. С повышением начального пересыщения (рис. 44, температура 30 °С) максимум распределения кристаллов по размерам сдвигается в сторону меньших размеров; с повышением температуры (рис. 45, $\alpha=1{,}17$) — в сторону бо́льших размеров. Интенсивность перемешивания при частоте вращения мешалки 60—240 об/мин не влияет ни на константу скорости кристаллизации, ни на размер кристаллов.

Кристаллизация при переменной температуре

В производстве кристаллизацию ведут с охлаждением горячих растворов, при этом пересыщение создают как начальной концентрацией раствора, так и его охлаждением. Вначале создают пересыщение, достаточное для зарождения центров кристаллизации ($\alpha=1{,}2\div1{,}3$). Когда они появятся, быстро начинается кристаллизация и резко снижается концентрация; поэтому темп охлаждения должен быть высоким. В последующее время он должен быть значительно ниже, так как скорость кристаллизации уменьшается.

Оптимальная начальная концентрация основного раствора лимонной кислоты 71—72 % мас. (безводной), для первого маточного раствора 70—71, для второго маточного раствора — 69. При более высокой концентрации кристаллизация начнется при температуре выше 37 °С; появятся очень мелкие кристаллы ангидридной кис-

лоты. На рис. 46 представлен оптимальный режим охлаждения растворов лимонной кислоты и размер образующихся при этом кристаллов [48].

Кристаллизуют лимонную кислоту в кристаллизаторе простейшей конструкции — вертикальном цилиндрическом сосуде со сферическим днищем, изготовленном из кислотоупорной стали, снабженном рубашкой для охлаждения водой и мешалкой.

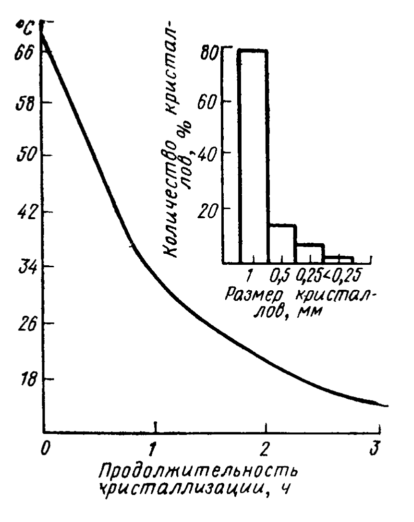


Рис. 46. Оптимальный режим охлаждения основных растворов лимонной кислоты.

Для снижения температуры раствора и удаления тепла, выделяющегося при кристаллизации лимонной кислоты (гидратной 28,62 кДж/моль, ангидридной 22,62), по заполнении кристаллизатора раствором лимонной кислоты в рубашку подают холодную воду и включают мешалку, которая непрерывно работает до конца выгрузки суспензии кристаллов в маточном растворе (утфеле) в центрифугу. Даже при кратковременной остановке мешалки происходит обрастание внутренней стенки аппарата кристаллами и осаждение их на дно кристаллизатора, что уменьшает коэффициент теплопередачи от раствора к воде и может привести к заклиниванию мешалки.

Температурный режим кристаллизации: охлаждение с 70 до 37 °C проводят со скоростью до 20° в 1 ч; от 37 до 27 °C — со скоростью 10°; с 27 до 22 °C — со скоростью 5° и до конечной температуры кристаллизации (8 °C) — со скоростью 3° в 1 ч. При конечной температуре раствор выдерживают 30 мин для «созревания» кристаллов.

При этом мелкие кристаллы растворяются, а относительно крупные растут (идет рекристаллизация). Мелкие кристаллы растворяются потому, что энергия кристаллической решетки у них меньше, молекулы (или ионы) на поверхности мелких кристаллов удерживаются слабее, чем в крупных кристаллах.

Кроме того, мелкие кристаллы имеют относительно бóльшую длину ребер и большее число углов, с которых молекулы отрываются значительно легче, чем с середины граней (данные Ю. Ю. Лурье).

При отсутствии холодильной установки конечная температура зависит от времени года. С понижением температуры выход кристаллов возрастает.

Затравку кристаллов лимонной кислоты размером около 0,25 мм в количестве 0,05 % (по массе кристаллизующегося раствора) вносят при температуре около 37 °C.

Выход кристаллов лимонной кислоты

Ожидаемый выход кристаллов может быть определен, если известны:

C_1 — начальная концентрация раствора, кг безводной кислоты на 1 кг растворителя (воды);

C_2 — конечная концентрация маточного раствора в тех же единицах;

W — начальная масса растворителя, кг или % мас.;

V — потеря растворителя при испарении в процессе кристаллизации, кг на 1 кг начального количества растворителя;

R — отношение молекулярных масс лимонной кислоты в гидратной и ангидридной форме (210:192=1,097);

Y — выход кристаллической лимонной кислоты, кг или % мас.

Выход кристаллов при кристаллизации в безводной форме и полной потере растворителя

$$Y = WC_1,$$

без потери растворителя

$$Y = W(C_1 - C_2)$$

и при частичной потере растворителя

$$Y = W[C_1 - C_2(1 - V)].$$

При кристаллизации в гидратной форме выход кристаллов при полной потере свободного растворителя

$$Y = WRC_1,$$

без потери растворителя

$$Y = \frac{WR(C_1 - C_2)}{1 - C_2(R - 1)}$$

и при частичной потере растворителя

$$Y = \frac{WR[C_1 - C_2(1 - V)]}{1 - C_2(R - 1)}.$$

Выход кристаллов моногидратной лимонной кислоты определяется по предпоследнему уравнению. Необходимые для расчетов концентраций лимонной кислоты в начальном и конечном растворах коэффициенты насыщения можно принять равными для основного раствора 1,04, для первого маточного раствора 1,09 и для второго — 1,20 [65]. Ожидаемый выход гидратной лимонной кислоты приведен в табл. 30.

Выход кристаллов является функцией начальной концентрации раствора, его чистоты и конечной температуры кристаллизации. При содержании кристаллов более 52 % утфель утрачивает подвижность.

Повысить выход кристаллов из II и III маточного раствора можно несколькими путями: добавлением серной кислоты и ионообменом. Первый путь был

Таблица 30

Ожидаемый выход гидратной кристаллической лимонной кислоты, %

Исходный раствор	Концентрация исходного раствора, % мас. безводной лимонной кислоты							
	69				70			
	Конечная температура кристаллизации, °С							
	20	15	10	5	20	15	10	5
Основной	27,82	33,34	38,10	42,40	31,00	36,40	40,90	45,00
	36,70	44,00	50,20	56,00	40,40	47,40	53,30	58,60
Первый маточный	24,55	30,60	35,60	40,20	28,00	33,80	38,60	42,86
	32,40	40,40	47,00	53,10	36,50	44,00	50,20	55,80
Второй маточный	13,70	21,37	27,60	33,20	17,64	24,90	30,89	36,25
	18,10	28,20	36,50	43,90	22,90	32,40	40,20	47,20

Продолжение табл. 30

Исходный раствор	Концентрация исходного раствора, % мас. безводной лимонной кислоты							
	71				72			
	Конечная температура кристаллизации, °С							
	20	15	10	5	20	15	10	5
Основной	34,38	39,51	43,70	47,70	37,55	43,00	46,50	50,20
	44,10	50,70	56,10	61,20	47,50	53,70	58,90	63,50
Первый маточный	31,40	36,96	41,50	45,60	—	—	—	—
	40,30	47,40	53,30	58,50	—	—	—	—
Второй маточный	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	—

Примечание: первая строка — по массе исходного раствора, вторая строка — по массе лимонной кислоты, содержащейся в исходном растворе.

предложен еще в 1935 г. М. А. Дрбоглавом. Этот способ применим только к последнему маточному раствору, так как межкристальный раствор после кристаллизации его направляют на повторную переработку (получение цитрата кальция). В табл. 31 приведены данные об увеличении выхода кристаллов лимонной кислоты.

При добавлении серной кислоты увеличивается не только выход кристаллов, но и скорость кристаллизации. Однако кристаллы получаются мельче. Концентрированную серную кислоту добавляют после охлаждения выпаренного маточника до 30—35 °С в количестве около 4 %. Второй путь [64] заключается в очистке маточников Н-катионитами с предварительной обработкой $BaCO_3$ с целью осаждения сульфат-ионов.

Таблица 31

Влияние серной кислоты на выход кристаллов лимонной кислоты в процессе кристаллизации ее из маточного раствора [65]

Добавлено серной кислоты, % к массе раствора	Выход кристаллов, %	Добавлено серной кислоты, % к массе раствора	Выход кристаллов, %
0	12,6	12	45,1
3	20,2	15	51,5
6	35,9	18	55,2
9	40,7	21	59,4

ОТДЕЛЕНИЕ КРИСТАЛЛОВ ОТ МАТОЧНОГО РАСТВОРА

Обычно кристаллы отделяют от маточного раствора на центрифугах, в которых центробежная сила, возникающая при вращении ротора, во много раз больше силы тяжести. Поэтому разделение кристаллов и маточного раствора происходит очень быстро. Интенсивность центрифугирования характеризуют фактором разделения Fr, показывающим, во сколько раз центробежная сила больше силы тяжести. Этот фактор вычисляют из отношения центробежного ускорения к ускорению свободного падения, которое в конечном итоге приобретает формулу:

$$\mathrm{Fr} = \frac{n^2 D}{1800},$$

где n — частота вращения ротора, об/мин; D — внутренний диаметр ротора, м.

Применяют подвесные центрифуги с нижней ручной выгрузкой осадка в кислотоупорном исполнении. Центрифуга ПМ-1200 (рис. 47) с ручным управлением состоит из ротора (барабана) диаметром 1,22 м и высотой 0,6 м, открытого сверху и снизу и перфорированного по боковой поверхности. Сверху ротор имеет борта, позволяющие создавать необходимый слой утфеля. Внизу ротор при помощи спиц розетки скреплен с вертикальным валом, вращающимся с частотой 316 и 960 об/мин. Нижнее отверстие барабана между спицами закрывают подъемным конусом.

Вертикальный вал подвешен на верхнем шариковом подшипнике и приводится в движение от вертикального электродвигателя, непосредственно соединенного с валом. Снаружи ротора устанавливают неподвижный кожух, закрывающийся крышкой. Внутри цилиндрические стенки барабана покрывают металлическими ситами.

Работу ведут в следующей последовательности. Приводят во вращение ротор и при частоте его вращения около 300 об/мин заливают утфель (суспензию кристаллов лимонной кислоты) на конус, с которого он под действием центробежной силы подни-

мается по стенкам ротора и располагается цилиндрическим слоем. Затем переключают ротор на частоту вращения 960 об/мин и при закрытой крышке начинают отделение маточного раствора от кристаллов лимонной кислоты. Через 1—1,5 мин, когда маточный раствор перестанет вытекать, кристаллы отмывают от прилипшего маточного раствора (пробеливают), равномерно опрыскивая чистой мягкой водой (конденсатом) температурой не выше 35 °С из специального разбрызгивателя до тех пор, пока отделяемая жидкость не осветлится. Когда вытекание последней прекратится, ротор останавливают, пользуясь ленточным тормозом. При остановленном роторе открывают крышку, поднимают конус и кристаллы кислоты выгружают лопатой через нижнее отверстие. Влажность кристаллов 2—3 %.

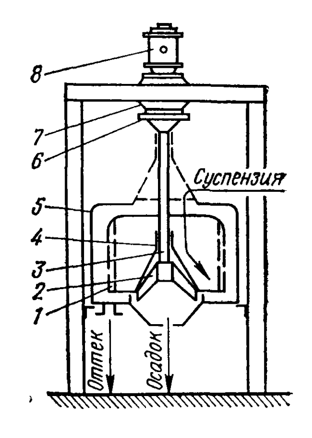


Рис. 47. Подвесная центрифуга:

1 — ротор; 2 — розетка с ребрами и ступицей; 3 — вал, 4 — конус; 5 — кожух; 6 — ленточный тормоз; 7 — шариковый подшипник; 8 — электродвигатель.

На продолжительность центрифугирования при прочих равных условиях оказывает влияние вязкость межкристального раствора, размер кристаллов (чем он меньше, тем дольше идет центрифугирование), особенно примесь мелких кристаллов ангидридной кислоты.

Более совершенны быстроходные автоматизированные центрифуги с программным управлением и механической выгрузкой осадка.

СУШКА КРИСТАЛЛОВ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

Для удаления поверхностной влаги кристаллы лимонной кислоты после центрифуг сушат, не затрагивая при этом гидратной воды. Лучшей признана барабанная сушилка.

Она представляет собой барабан из кислотоупорной стали, на внутренней поверхности которого закреплено несколько рядов лопаток, расположенных по винтовой линии. Влажные кристаллы кислоты подают в барабан элеватором. При медленном вращении барабана кислота захватывается лопатками, поднимается ими, ссыпается тонкими струйками вниз и вновь подхватывается другими лопатками. Эти операции повторяются несколько раз. Кислота, пересыпаясь, одновременно передвигается к противоположному концу барабана, где установлено сито для отделения комков.

В сушилку подают теплый воздух, который нагнетают вентилятором и нагревают в калорифере. Температура воздуха должна быть не выше: при входе в сушилку 70 °С, при выходе — 35 °С. Поступление воздуха и сырых кристаллов — параллельное, противоток недопустим, иначе температуру поступающего воздуха пришлось бы снизить во избежание выделения из лимонной кис-

лоты гидратной воды, расплавления в ней кристаллов и образования комков. Для предохранения кристаллической кислоты от загрязнения пылью, а также от заражения микроорганизмами продуваемый воздух очищают на фильтрах.

Равномерность сушки в значительной мере зависит от размера кристаллов, поэтому важно, чтобы он был возможно одинаковым. Это условие еще более важно при сушке в аппаратах с кипящим слоем, в которых мелкие кристаллы, наоборот, будут выходить из сушилки недосушенными, а крупные — пересушенными.

В результате многократного пересыпания в сушилке часть кристаллов истирается и превращается в пыль. Для улавливания ее устанавливают циклон и мокрый скруббер. Высушенную кислоту охлаждают (без охлаждения она склонна к комкованию).

УПАКОВКА И ХРАНЕНИЕ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

Лимонная кислота по качеству должна соответствовать показателям, предусмотренным ГОСТ 908—79 (табл. 32). Это должны быть бесцветные кристаллы или белый порошок, без комков, для кислоты I сорта допускается желтоватый оттенок, вкус кислый, без постороннего привкуса, 2%-ный раствор кислоты

Таблица 32

Химические показатели лимонной кислоты

Показатели	Нормы для сортов		
	экстра	высший	первый
Массовая доля лимонной кислоты в пересчете на моногидрат, %			
не менее	99,5	99,5	99,5
не более	101,0	Не нормируется	
Цвет, единицы показателя цветности раствора йодной шкалы, не более	4	6	10
Массовая доля, %, не более			
золы	0,07	0,10	0,35
свободной серной кислоты	0,01	0,01	0,03
мышьяка	0,00007	0,00007	0,00007
Проба			
на свинец, медь, цинк, олово с сероводородом	Выдерживает анализ		
на оксалаты с ацетатом кальция	То же		
на барий с серной кислотой	»		
на ферроцианиды с хлорным железом	Выдерживает анализ	»	
на сульфаты с хлоридом бария		Не нормируется	
Массовая доля сульфатной золы, %, не более	0,1	То же	
Проба на легкообугливающиеся вещества с серной кислотой	Выдерживает анализ	»	
Проба иа железо с 1,10-фенантролином	То же	»	

в дистиллированной воде должен не иметь запаха, быть прозрачным и не содержать механических примесей, структура — сыпучая, сухая, наощупь не липкая, без посторонних примесей.

За рубежом лимонную кислоту классифицируют по величине кристаллов на ситовых аппаратах. Большое внимание обращают на легкообугливающиеся вещества, дающие окраску при нагревании в течение определенного времени с концентрированной серной кислотой при температуре 90 °С. Они вызываются следами органических соединений — сахара, оксиметилфурфурола, других альдегидов и спиртов, за исключением цис- и транс-аконитовой, изолимонной, щавелевой, янтарной и олеиновой кислот, эритрита, ксилита и сорбита [93].

Для удаления легкообугливающихся веществ предложено много способов: выделение цитрата кальция в присутствии 10 % пероксида водорода к количеству лимонной кислоты; нагревание до кипения растворов лимонной кислоты после отделения гипса в сочетании с обработкой пероксидом водорода; добавление к раствору лимонной кислоты перед кристаллизацией борной кислоты в количестве 0,1—0,3 % по массе раствора, экстракция фреоном и др.

Наиболее эффективным способом очистки кристаллов лимонной кислоты от всех примесей является перекристаллизация. Лимонная кислота сорта экстра по всем показателям и нормам соответствует данным Британской фармакопеи 1968 г.

Лимонная кислота выпускается только в упакованном виде: реализуемая через розничную сеть — в мелкой фасовке массой нетто 10—100 г; предназначенная для предприятий пищевой и других отраслей промышленности — в крупной фасовке массой нетто 10—40 кг. При фасовке допускаются отклонения по массе нетто, не превышающие при массе до 50 г ±4 %, от 50 до 110 г ±3 %. При упаковке кислоты в ящики и мешки допускаются отклонения, не превышающие ±0,5 %.

Мелкая фасовка должна проводиться в пакеты из «пищевой» нестабилизированной полиэтиленовой пленки марки Н, толщиной не менее 0,08 мм; из этикетировочной бумаги односторонней гладкости, ламинированной с внутренней стороны полиэтиленом высокого давления или пачки из бумаги марки Е по ГОСТ 7247—73 с внутренним вкладышем из подпергамента марки П-3. Пакеты и пачки оформляют красочными рисунками и надписями (товарный знак или наименование предприятия-изготовителя и его подчиненность, наименование продукции и ее сорта, дата выработки, масса нетто, цена, обозначение настоящего стандарта). Пакеты и пачки с кислотой должны упаковываться в ящики из гофрированного картона № 13 массой нетто не более 10 кг.

Крупная фасовка проводится в льно-джуто-кенафные тканевые мешки или льняные продуктовые массой нетто не более 40 кг, в ящики из гофрированного картона. Внутрь мешков или ящиков должны вставляться мешки-вкладыши из полиэтиленовой пленки, которые после заполнения кислотой герметически закрывают путем сварки. Допускается завязка увязочным шпагатом из лубяных волокон. Верхние швы тканевых наружных мешков зашивают машинным способом льняными нитками или вручную — увязочным шпагатом из лубяных волокон.

При внутригородских перевозках допускается упаковка кислоты в бумажные непропитанные открытые трехслойные мешки с внутренним мешком-вкладышем из полиэтиленовой пленки массой нетто не более 25 кг; в ящики из гофрированного картона, выстланные подпергаментом марки П-3, полностью покрывающим всю внутреннюю поверхность тары.

Транспортную тару маркируют с нанесением манипуляционного знака «Боится сырости».

На ряде заводов крупная фасовка лимонной кислоты механизирована: установлены полуатоматические весы, зашивочные машины и транспортное оборудование.

Фирма American Association of Cereal Chemist Inc. выпускает лимонную кислоту в капсулах, которые защищают другие ингредиенты пищи от кислоты. Капсулы изготовляют трех типов: из частично гидрогенизированного растительного масла, мальтодекстрина и эмульгатора. Первый тип разрушается при температуре плавления оболочки, второй — при растворении в воде, третий — при нагревании в воде.

Преимуществом такой формы упаковки лимонной (и других пищевых кислот) является контролируемая скорость освобождения кислоты из капсулы, равномерное распределение кислоты по всему объему без образования комков Пищевые кислоты в капсулах применяют в кулинарии — для увеличения срока хранения пудингов и начинок для пирогов, предотвращая реакцию между кислотой и крахмалом во время хранения, для увеличения срока хранения теста и т. д.

Лимонная кислота в крупной фасовке должна храниться в закрытом помещении на деревянных стеллажах или поддонах при относительной влажности воздуха не выше 70 %. Гарантийный срок хранения лимонной кислоты — 6 мес со дня изготовления; при упаковке в ящики из гофрированного картона с внутренним вкладышем из подпергамента — 3 мес.

Для хранения кристаллической кислоты большое значение имеет гигроскопичность. Под гигроскопичностью понимают свойство веществ поглощать водяные пары из воздуха независимо от характера связывания ими влаги. Движущей силой влагообмена является разность парциальных давлений водяного пара в воздухе и над поверхностью вещества. При равенстве парциальных давлений влагообмен прекращается, наступает состояние динамического равновесия, а влажность вещества, соответствующая этому состоянию, называется равновесной (гигроскопической точкой).

Как видно из рис. 48 [11], при относительной влажности воздуха $\varphi=80$ %, температуре 20 °С кривая сорбции влаги безводными кристаллами вначале идет круто вверх и по достижении величины, соответствующей содержанию кристаллизационной воды, резко перегибается. Дальнейшее поглощение влаги происходит относительно медленно. Наличие перегиба на кривой свидетельствует о фазовом переходе.

При $\varphi\geqslant90$ % через 7 мес получается раствор; при $\varphi=100$ % кристаллы поглощают в 4,6 раза больше влаги, чем их безводная масса. На воздухе с $\varphi\leqslant70$ % влага сорбируется до образования моногидрата лимонной кислоты. Содержание гигроскопической влаги за 13 мес хранения не превышает 0,1 % (0,001 кг/кг).

Кинетика сорбции влаги моногидратными кристаллами лимонной кислоты при температуре 22 °С в зависимости от относительной влажности воздуха представлена на рис. 49 [82]. Так же, как и безводные, моногидратные кристаллы при постоянной температуре поглощают влаги тем больше, чем выше относительная влажность воздуха. При постоянной относительной влажности воздуха скорость поглощения влаги возрастает с повышением температуры, уменьшением размера кристаллов и снижением их чистоты.



Рис. 48. Кинетика сорбции влаги безводными кристаллами лимонной кислоты.

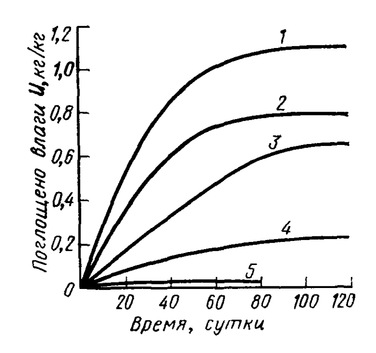


Рис. 49. Кинетика сорбции влаги моногидратными кристаллами лимонной кислоты при φ, %:

1 — 91,3; *2* — 87,3; *3* — 84,0; *4* — 80; *5* — 75,2.

У моногидратных кристаллов в первый период происходит очень быстрая моно- и полимолекулярная адсорбция водяных паров из воздуха, затем — в трещинах кристаллов и образуемых кристаллами капиллярах — влага ожижается. Получающийся насыщенный раствор лимонной кислоты обволакивает кристаллы и вследствие одновременно идущего поглощения ими влаги разбавляется. Разность (градиент) концентрации непосредственно на поверхности кристаллов и в растворе приводит к диффузии кислоты в раствор и в конце концов — к полному растворению кристаллов.

Момент образования насыщенного раствора свидетельствует о конце адсорбции и начале абсорбции влаги. По изотерме сорбции (рис. 50) невозможно точно провести границу между этими процессами, между гигроскопической влажностью и влажным состоянием, а следовательно, и установить гигроскопическую точку, т. е.

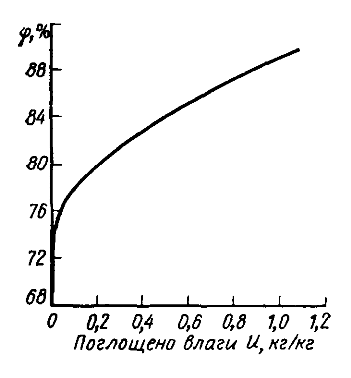


Рис. 50. Изотерма сорбции влаги моногидратными кристаллами лимонной кислоты.

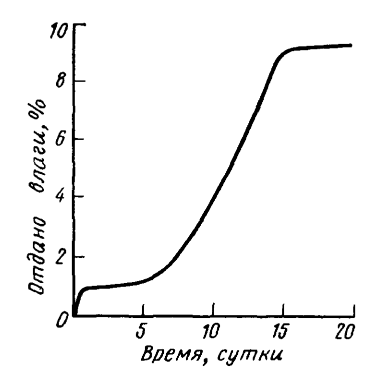


Рис. 51. Кинетика десорбции влаги из моногидратных кристаллов лимонной кислоты

относительную влажность воздуха, при которой кристаллы не поглощают и не выделяют влаги. Заметное поглощение влаги кристаллами моногидратной лимонной кислоты наблюдается при $\varphi > 68$ %, которая при температуре 20 °C в первом приближении может быть принята за гигроскопическую точку. При меньшей величине φ начинает удаляться кристаллизационная вода [82].

Следует заметить, что между количественными данными, приведенными на рис. 49 и 50, в части водопоглощения кристаллогидратом лимонной кислоты имеется несогласованность. Это объясняется тем, что исследователи пользовались различными методами подготовки образца лимонной кислоты, различными размерами гидростатов, толщиной слоя и размером кристаллов, расстоянием между кристаллами и раствором, насыщающим воздух парами влаги. Однако приведенные данные позволяют проследить основные закономерности сорбции влаги.

Скорость влагоотдачи моногидратными кристаллами лимонной кислоты концентрированной серной кислоте при температуре 20 °C показана на рис. 51 [11]. Кривая влагоотдачи имеет два перегиба, первый из которых характерен для удаления гигроскопической влаги, второй — для полного обезвоживания. Гигроскопическая влага десорбируется значительно быстрее, чем гидратная.

Адсорбция влаги является экзотермическим процессом, десорбция — эндотермическим. Количественной мерой энергии связи служит теплота сорбции, которая для кристаллов лимонной кислоты в среднем равна 40 кДж/кг поглощенной влаги и очень мало зависит от величины U (количества поглощенной влаги, кг/кг моногидратной лимонной кислоты). По сравнению с природными высокополимерами, особенно в начальной стадии адсорбции, теплота сорбции в 30—40 раз меньше [82].

Слеживание кристаллов во время хранения вызывается увлажнением их поверхностей, образованием пленок насыщенного раствора, при испарении которых происходит вторичная кристаллизация и соединение соседних кристаллов. Поверхность может увлажняться вследствие недосушки и попадания внешней влаги. Увеличивает слеживание большая неоднородность кристаллов по размеру (крупные кристаллы слеживаются меньше). Причиной слеживания может быть высокая температура упаковки (30—35 °C) по сравнению с температурой хранения. Недопустимы резкие изменения температуры в хранилище, превышающие ±5 °C. Когда мешки складывают один на другой, в нижних из них кристаллы быстрее слеживаются и возможно их крошение.

ПЕРЕРАБОТКА МАТОЧНЫХ РАСТВОРОВ

Маточные растворы (маточники, оттеки), получающиеся при кристаллизациях растворов лимонной кислоты, не смешивают между собой и с основным раствором лимонной кислоты, а перерабатывают отдельно, чтобы не ухудшать качества готового продукта.

Первый маточный раствор. Раствор выпаривают до концентрации 69 %, затем кристаллизуют, центрифугируют, кристаллы промывают и сушат. Кристаллизацию ведут по следующему режиму охлаждения: от 70 до 36 °C со скоростью 20 °C в 1 ч; от 36 до 26 °C — со скоростью 10°, от 26 до 21 °C — со скоростью 5° и затем до конечной температуры кристаллизации — со скоростью 3—2° в 1 ч. При конечной температуре утфель выдерживают 30 мин. Затравку кристаллов вносят, как обычно.

Из полученных кристаллов и продукта основной кристаллизации составляют товарные партии лимонной кислоты. При выработке кислоты высшего сорта маточный раствор перед выпариванием нагревают до 70 °C и в течение 30 мин осветляют 1—2 % активного угля (к массе кислоты), затем фильтруют на фильтр-прессах.

Второй маточный раствор. Этот раствор, а иногда и третий, обрабатывают активным углем; после проверки на полноту разложения цитрата раствор фильтруют, выпаривают до концентрации не менее 69 %, утфель центрифугируют, кристаллы промывают и сушат.

Режим охлаждения при кристаллизации: от 70 до 36 °C — со скоростью 20° в 1 ч, от 36 до 24 °C — со скоростью 10°, от 24 до 20 °C — со скоростью 4°. Затем до конечной температуры со скоростью 2° в 1 ч. При конечной температуре выдерживают утфель 1 ч. Затравку дают в количестве 0,1 % по массе раствора.

Товарные кристаллы, полученные из этих маточных растворов, отвечают показателям кислоты первого сорта. Третий маточный раствор перерабатывают в основных нейтрализаторах отдельно или вместе с культуральной жидкостью.

При переработке очень загрязненных маточных растворов (вторых, а иногда и третьих) кроме осветления активным углем их обрабатывают 1 % $CaCl_2$ (к массе кислоты) для снижения содержания ионов SO_4. Для получения кислоты сорта экстра (при отсутствии ионообменной установки) кристаллы, полученные из всех маточных растворов, перекристаллизовывают.

При наличии ионообменной установки первый и второй маточные растворы уваривают без осветления. Третий маточный раствор осветляют 1 % активного угля и после фильтрования присоединяют к основному раствору.

ЧАСТЬ

3

ТЕХНОЛОГИЯ МОЛОЧНОЙ И ВИННОЙ КИСЛОТ

Глава 9. ТЕХНОЛОГИЯ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И ХРАНЕНИЕ СЫРЬЯ

В отечественном производстве молочной кислоты сырьем служит смесь тростникового сахара-сырца, рафинадной патоки и свекловичной мелассы. Состав свекловичной мелассы был приведен на с. 97.

Тростниковый сахар-сырец

Тростниковый сахар-сырец является полупродуктом производства сахара из сахарного тростника и в СССР импортируется. По внешнему виду — это сухой сыпучий порошок с приятным овощным запахом и слабокислой реакцией раствора (pH 6,5—6,8). Сахар-сырец содержит 99,4—99,6 % сухих веществ и 0,4—0,8 % редуцирующих веществ. Органических несахаров — 0,5—0,8 %, в том числе общего азота 0,03—0,15 % (0,80—3,0 мг-экв аминокислот), коллоидов (гумми, восков, крахмала) 0,3—1,27 % и минеральных веществ (карбонатной золы) 0,3—0,5 %. Примерный состав золы (в %): 0,12 K_2O; 0,09 CaO; 0,028 MgO; 0,007 Na_2O и другие элементы в очень небольших количествах (фосфор — от следов до 0,03 P_2O_5). Средний размер кристаллов 1,24 мм, коэффициент их неоднородности — 35 %.

Состав микрофлоры приведен в табл. 33 (по Г. А. Ермолаевой). Выделено 133 чистые культуры, которые представлены Bac. mesentericus, Bac. megaterium, Bac. subtilis, Bac. thermodiastaticus, Bac. cereus, Actinomyces, Micrococcus и дрожжами.

Таблица 33

Микрофлора тростникового сахара-сырца (ед. на 10 г сахара)

Образцы сахара	Мезофилы			Термофилы		
	общее количество	кокки	спороносные палочки	общее количество	спороносные палочки	актиномицеты
1	1300	260	1040	950	330	570
2	1225	250	975	925	370	555
Среднее значение	1260	255	1005	940	375	565

Тростниковый сахар получают в мешках или в крытых вагонах насыпью. Хранят его в таком же виде в закрытых сухих (с относительной влажностью воздуха 60—70 %) складах при возможно низкой температуре. Во время длительного хранения в пленке маточного раствора, окружающей кристаллы, происходит гидролиз сахарозы. Образующийся инвертный сахар очень гигроскопичен, поэтому, поглощая влагу из воздуха, кристаллы намокают, и развивается меланоидиновая реакция, приводящая к увеличению цветности и повышению содержания коллоидов.

Рафинадная патока

Рафинадная патока — отход производства сахара-рафинада из свекловичного сахара, используемого для промышленной переработки, или тростникового сахара-сырца. Выход рафинадной патоки (в пересчете на условную с 80 % сухих веществ и 71 %-ной доброкачественнностью) составляет 1,5—2,0 % к массе введенной в производство сахарозы. В СССР ежегодно получается 30—35 тыс. т рафинадной патоки, используемой в хлебобулочных и кондитерских изделиях (80 %) и в производстве молочной кислоты (15 %). На технические цели расходуется рафинадная патока, получаемая при выработке сахара-рафинада с применением ионообмена.

Согласно ОСТ 18—233—75 Минпищепрома СССР, рафинадная патока — густая вязкая коричневая жидкость сладкого вкуса с горьким привкусом, содержащая сухих веществ не менее 72 %, сахарозы (по прямой поляризации) не менее 49 % и имеющая pH не ниже 5,5 (при определении без разбавления). Другие показатели не регламентированы. Рафинадная патока по сравнению со свекловичной мелассой имеет бо́льшую доброкачественность, примерно вдвое меньшую цветность, содержит меньше коллоидов (1,3—3,0 %), золы (3—5 %) и общего азота (0,25 %), больше — инвертного сахара (10—20 %). В ней присутствуют витамины.

Так как при производстве молочной кислоты, даже в лучшем случае, проводят только одну кристаллизацию — лактата кальция (тогда как в производстве лимонной кислоты всегда осуществляют две кристаллизации — цитрата кальция и самой лимонной кислоты), то большое внимание уделяют цветности и содержанию примесей, особенно минеральных. С этой точки зрения желательно иметь в смеси сырья больший процент сахара-сырца, до 30 % рафинадной патоки и немного свекловичной мелассы.

Рафинадную патоку хранят так же, как и мелассу.

ХИМИЗМ МОЛОЧНОКИСЛОГО БРОЖЕНИЯ И ЕГО ВОЗБУДИТЕЛЬ

Молочнокислое брожение известно с незапамятных времен. Этот вид брожения впервые изучил Л. Пастер в 1857 г. и установил его биологическую природу.

Гомоферментативное молочнокислое брожение выражается следующей суммарной химической реакцией:

$$\underset{180}{C_6H_{12}O_6} \rightarrow \underset{180}{CH_3CH(OH)COOH} + 94{,}2 \text{ кДж.}$$

В действительности оно происходит сложнее. Вначале в результате гликолиза из одной молекулы моносахарида образуются две молекулы пировиноградной кислоты и две молекулы НАД.H_2 (с. 87). Пировиноградная кислота в анаэробных условиях не превращается в уксусный альдегид, как при спиртовом брожении, так как молочнокислые бактерии лишены фермента пируваткарбоксилазы. Поэтому не уксусный альдегид, а сама пировиноградная кислота принимает водород от восстановленной формы НАД.H_2 и превращается в молочную кислоту

$$\begin{array}{c} CH_3 \\ | \\ C{=}O \\ | \\ COOH \end{array} \xrightarrow{\text{НАД}\cdot H_2} \begin{array}{c} CH_3 \\ | \\ CHOH \\ | \\ COOH \end{array} + \text{НАД}$$

Реакция катализируется ферментом лактатдегидрогеназой.

По В. Н. Шапошникову молочная кислота образуется не через пировиноградную кислоту, а непосредственно из 3-фосфоглицеринового альдегида путем окисления его альдегидной группы и восстановления спиртового гидроксила. Молочнокислое гомоферментативное брожение идет в две стадии. В первую из них, в экспоненциальной фазе роста бактерий, 3-фосфоглицериновый альдегид окисляется в 3-фосфоглицериновую кислоту с одновременным восстановлением НАД:

$$\begin{array}{l} CH_2\cdot O(P) \\ | \\ CHOH \\ | \\ C{\lt}^{O}_{H} \end{array} + H_2O + \text{НАД} \longrightarrow \begin{array}{l} CH_2\cdot O(P) \\ | \\ CHOH \\ | \\ COOH \end{array} + \text{НАД}\cdot H_2$$

Во второй стадии параллельно с образованием НАД·H_2 происходит постепенное снижение rH_2, которое приводит к передаче водорода с НАД·H_2 на 3-фосфоглицериновую кислоту и восстановлению ее в молочную:

$$\begin{array}{l} CH_2\cdot O(P) \\ | \\ CHOH \\ | \\ COOH \end{array} + H_2O + \text{НАД}\cdot H_2 \longrightarrow \begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CHOH \\ | \\ COOH \end{array} + H_3PO_4 + \text{НАД} + H_2O$$

Свое представление авторы подтверждают тем, что добавленная в среду пировиноградная кислота не восстанавливается в молочную кислоту, а из нее образуются C_2- и C_1-соединения [80].

По К. Нейбергу, последним продуктом перед молочной кислотой является метилглиоксаль:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow \underset{\text{Глицеринальдегид}}{CH_2OH.CHOH.CHO} \rightarrow \underset{\text{Метилглиоксаль}}{CH_3CO.CHO} \rightarrow \underset{\text{Молочная кислота}}{CH_3.CH(OH).COOH}$$

К. Бернгауер показал, что молочная кислота образуется и через пировиноградную кислоту и через метилглиоксаль.

В растворе могут происходить сложные превращения:

Глицеринальдегид $\xrightarrow{+H_2}$ Глицерин ⟶ Гипотетическое C_3-соединение ⟶ Молочная кислота ⟶ Пировиноградная кислота и 2H $\xrightarrow{+H_2O}$ Уксусная кислота $+CO_2+2H$.

Гомоферментативное молочнокислое брожение может вызываться микроорганизмами различных таксономических групп, но главным образом бактериями и микроскопическими грибами. Среди последних известны некоторые виды ризопуса и мукора. Оптическая активность образующейся молочной кислоты зависит от стереоспецифичности лактатдегидрогеназы, а также от того, обладает ли микроорганизм лактатрацемазой.

Чаще применяют гомоферментативные бактерии, образующие до 98 % молочной кислоты. Наилучшим источником углерода для них является глюкоза. Молочнокислые бактерии характеризуются ярко выраженной специфичностью по отношению к сахарам: бактерии, развивающиеся на растительных объектах (Lactobacillus), предпочитают мальтозу; развивающиеся на молоке и молочных продуктах (Streptococcus), — лактозу. L. delbrückii ассимилирует также фруктозу, галактозу и сахарозу, не ассимилирует лактозу, раффинозу и полисахариды. Для конструктивного и энергетического обмена может использовать лимонную, яблочную, пировиноградную и другие кислоты. Лимонная и уксусная кислота стимулируют рост бактерий. Молочнокислые бактерии мало чувствительны к содержанию в среде меланоидинов. Палочковые формы дают больший выход молочной кислоты.

КУЛЬТУРА LACTOBACILLUS DELBRÜCKII

Возбудителем молочнокислого брожения в производстве молочной кислоты является Thermobacterium cereale — термофильная зерносусловая бактерия. Она была открыта Лейхманом еще в 1896 г. и названа им в честь известного микробиолога М. Дельбрюка Bacillus derbrückii. Родовое название этих бактерий по существу ошибочное, так как все молочнокислые бактерии, за редким исключением (к которому не принадлежит и L. delbrückii), не образуют спор. Однако это название рода так укоренилось, что оно осталось и в современной номенклатуре бактерий.

Молочнокислые бактерии положительно окрашены по Граму, неподвижные факультативные анаэробы. Палочки крупные, длиной 7—8 мкм, толщиной 0,5—0,8 мкм, образующие, как правило, короткие цепочки из 2—4 клеток. Особенностью их конструктивного метаболизма являются слаборазвитые биосинтетические способности и, как следствие, сильная зависимость роста от наличия готовых органических веществ (аминокислот, витаминов группы В, компонентов нуклеиновых кислот). Это свидетельствует о примитивности их конструктивного метаболизма и о появлении данных бактерий на ранних стадиях развития жизни на Земле. Культи-

вирование молочнокислых бактерий на синтетических средах не удается; это — типичная сусловая культура.

L. delbrückii требовательны к азотному питанию. Набор необходимых аминокислот тщательно не изучен, но, как и большинству молочнокислых бактерий, им необходим аргинин, цистеин, глютаминовая кислота, лейцин, фенилаланин, триптофан, тирозин и лизин, а, возможно, еще и некоторые другие (L. casei, например, требуется 16 аминокислот). Из витаминов необходимы рибофлавин, никотиновая или фолиевая кислота; тиамин ингибирует образование молочной кислоты. Потребность в витаминах зависит от температуры культивирования, pH и rH_2.

Для молочнокислых бактерий нужны натрий, калий, фосфор, медь, железо, сера, магний и особенно марганец. Цинк ускоряет рост бактерий, но подавляет образование молочной кислоты.

К сахарсодержащим средам предложено добавлять: сухие ростки (корешки) ячменного, ржаного и пшеничного солода, солодовый экстракт, осадочные винные и спиртовые дрожжи, дрожжевой автолизат, пшеничные зародыши, молоко, сухой порошок хлореллы и т. д. Обычно пользуются сухими ячменными ростками.

Солодовые ростки содержат до 30 % азотистых веществ ($N \times 6{,}25$), около половины которых растворяется в воде. Из свободных аминокислот в ростках найдены: аспарагиновая и глютаминовая кислоты, аргинин, гистидин, лизин, серин, гликокол, треонин, аланин, валин, метионин, лейцин, изолейцин, β-фенилаланин, пролин. Амиды представлены главным образом аспарагином. Из углеводов, кроме клетчатки и гемицеллюлоз, содержится около 20 % глюкозы и фруктозы, немного мальтозы. В ростках заключена основная масса витаминов и биостимуляторов проросшего зерна (рибофлавин, пиридоксин, цианокобаламин, никотиновая и пантотеновая кислоты, токоферол, инозит, биотин) [73].

Недостатком солодовых ростков является сильное впитывание влаги и набухание, что повышает вязкость культуральной жидкости и ухудшает последующее отделение ростков фильтрованием. Ростки должны быть желтого или коричневого цвета, неподгоревшие, незаплесневевшие, с хлебно-солодовым запахом, горьковатые на вкус. По техническим условиям допускается содержание зерновой примеси 5—6 %, минеральной не более 0,5 %, влажность не выше 10 %.

На рис. 52 сопоставлено влияние принятых способов очистки ростков от микрофлоры и применения непастеризованных ростков на ход брожения. Обработка ростков 6%-ным раствором молочной кислоты в течение 2 ч или пастеризация в питательной среде 1 ч дает худшие результаты, чем непастеризованные ростки: не только увеличивается продолжительность брожения, но снижается выход молочной кислоты, увеличивается содержание несброженного сахара. Это происходит потому, что вследствие низкого pH (1,8—2,0) в 6%-ном растворе молочной кислоты инактивируются протеолитические ферменты ростков, а при температуре 70 °С факторы роста разрушаются. Внесение в питательную среду нестерильных рост-

ков создает благоприятные условия для протеолиза белков, накопления растворимого азота и развития молочнокислых бактерий. Одновременно количество посторонней микрофлоры быстро снижается [30].

Аминный азот, вносимый в питательную среду с ростками, используется бактериями приблизительно на половину. Степень ассимиляции других компонентов ростков неизвестна.

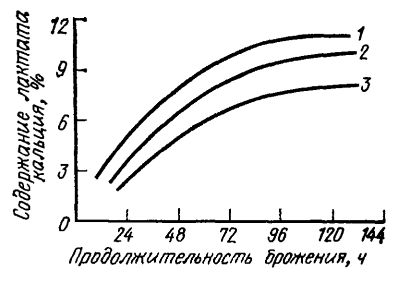


Рис. 52 Кинетика накопления лактата кальция при брожении в присутствии солодовых ростков:

1 — нестерильных, 2 — обработанных 6 %-ным раствором молочной кислоты; 3 — пастеризованных при температуре 70 °С.

Оптимальной температурой для развития L. delbrückii считается 48—50 °С (см. с. 17). Достаточной чистоте брожения способствует также слабокислая реакция среды. Оптимальный pH находится около 5,5, несколько изменяясь от состава среды, ее концентрации, температуры сбраживания и штамма молочнокислых бактерий. При pH 4,5 развитие бактерий задерживается, при pH 3,0 — прекращается. Молочнокислые бактерии лучше развиваются при pH 5,8—6,0, но появляется опасность заражения посторонними бактериями. При pH 7 и выше питательная среда утрачивает защитные свойства и инфицируется.

Молочнокислые бактерии не имеют геминовой системы, водород переносится не на молекулярный кислород, как у аэробов, а на органические соединения, образующиеся в процессе брожения (пировиноградную кислоту, а, возможно, на 4-фосфоглицериновую кислоту). Поэтому они аэротолерантны, присутствие воздуха не оказывает на них влияния при rH_2 от 1 до 30.

L. delbrückii очень чувствительны к кислотности среды, поэтому при накоплении молочной кислоты ее нейтрализуют мелом:

$$\underset{180}{2C_3H_6O_3} + \underset{100}{CaCO_3} \rightarrow \underset{218}{Ca(C_3H_5O_3)_2} + \underset{44}{CO_2} + \underset{18}{H_2O}$$

Кислотность поддерживают на уровне 0,3—0,4 %. Лактат кальция, образующийся при нейтрализации кислоты, должен находиться в растворенном состоянии, растворимость его возрастает с повышением температуры среды и при 50 °С составляет 15—16 %. Следовательно, температура не только создает элективные условия для развития молочнокислых бактерий, но и способствует большему накоплению лактата. При низкой температуре брожения производство молочной кислоты было бы неэкономичным.

Для молочнокислого брожения в отечественной промышленности испытаны штаммы: 52 (спиртовый), 83 (выделенный в свое время из бродильных чанов Минского завода молочной кислоты), БДШ (бактерия Дельбрюка и Шапошникова), БД-XII и Л-3. Лучшим штаммом оказался последний, выделенный в 1976 г. в

ЛНИИППе отбором естественно возникающих мутантов в штамме БДШ, культивируемом в лаборатории в течение 10 лет [46]. Он на двое суток быстрее сбраживает среду, среднесуточное накопление лактата повышается с 1,1 до 1,5 %, снижается содержание несброженного сахара с 0,5 до 0,3 %. Так как молочнокислые бактерии уже образуют до 98 % молочной кислоты к массе сахара, то их селекция должна быть направлена на увеличение скорости брожения. Комбинация различных штаммов не была эффективной.

ВЫХОД МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ В ПРОЦЕССЕ БРОЖЕНИЯ

Согласно химическому уравнению (с. 198), из 100 г гексоз получается 100 г молочной кислоты, из 100 г дисахаридов (сахарозы, мальтозы) (360 : 342) 100 = 105,2 г.

В культуральной жидкости, кроме молочной кислоты, небольших количеств пировиноградной и уксусной кислот, глицерина, найден D-маннит, который образуется из D-фруктозы по реакции:

$$\text{Фруктоза} + \text{НАДФ.H}_2 \rightarrow \text{Маннит} + \text{НАДФ}.$$

Реакция катализируется маннитолдегидрогеназой.

Молочнокислое брожение в производственных условиях не является чистым, из воздуха попадают пропионовые, маслянокислые и другие бактерии.

Пропионовые бактерии родственны молочнокислым бактериям и часто совместно с ними развиваются. Это бесспоровые медленно размножающиеся палочки, факультативные анаэробы, имеющие цитохром и ферменты цикла трикарбоновых кислот; оптимальная температура для роста 30—35 °С. Пропионовая кислота образуется различными путями: при восстановлении пировиноградной или молочной кислот, их солей, при декарбоксилировании янтарной кислоты. Пропионовое брожение обычно следует за молочнокислым и приводит к образованию различных продуктов:

$$\underset{\text{Молочная кислота}}{3CH_3CH(OH)COOH} \rightarrow \underset{\text{Пропионовая кислота}}{2CH_3CH_2COOH} + \underset{\text{Уксусная кислота}}{CH_3COOH} + CO_2 + H_2O + X \text{ кДж}.$$

В обмен веществ пропионовых бактерий вовлекается диоксид углерода, образуя при взаимодействии с пировиноградной кислотой янтарную кислоту.

Маслянокислые бактерии (род Clostridium) — строго анаэробные споровые палочки, оптимальная температура для роста 30—40 °С. Cl. lactoacetophilum и Cl. butyricum могут сбраживать не только сахар, но и лактат в присутствии ацетата или пирувата:

$$2(CH_3CHOHCOO)_2Ca + H_2O \rightarrow (CH_3CH_2CH_2COO)_2Ca + CaCO_3 + 3CO_2 + 4H_2.$$

Маслянокислое брожение иногда начинается после молочнокислого.

На посторонние брожения, преимущественно на образование летучих кислот — уксусной пропионовой и масляной — расходуется 4—5 % сахара [96]. Некоторое количество сахара затрачивается на синтез клеточного вещества в основном молочнокислых бактерий Количество сухой бактериальной массы достигает 2,6 % к введенному сахару [39]. Принимая содержание углерода в ней 50 %, в сахарозе 42 %, расход сахарозы будет $(1{,}3 \times 100):42 \simeq 3$ %, а с учетом неидентифицированных продуктов брожения 4 %.

Содержание несброженного сахара составляет около 4 %.

Таким образом суммарные затраты сахара, не приводящие к образованию молочной кислоты, составляют около 12 %.

Сбраживается сахара в молочную кислоту

$$100 - 12 = 88\%.$$

Из этого количества сахара должно получиться молочной кислоты

$$1{,}052 \times 88 \simeq 92{,}6\%.$$

По многочисленным данным и принятому в отечественном производстве режиму практический выход молочной кислоты в процессе брожения достигает 90—91 % к массе сахара, обычно колеблется от 83 до 89 %, составляя в среднем 85—86 %. Меньший выход указывает на нарушение режима брожения: недостаточную чистоту брожения, большой процент несброженного сахара и др.

КИНЕТИКА МОЛОЧНОКИСЛОГО БРОЖЕНИЯ

Процесс брожения разделяется на две фазы, в первой оно идет в условиях размножения бактерий, во второй — без увеличения их общей численности за счет жизнеспособных клеток. Сколько делящихся, жизнеспособных и мертвых клеток присутствует в каждый момент, неизвестно. Кинетика брожения зависит от многих факторов.

В первом приближении можно считать скорость молочнокислого брожения, как и других ферментационных процессов, за реакцию первого порядка и кинетическую константу — независящей от начальной концентрации сахара.

На рис. 53 [30] показано влияние количества добавленных солодовых ростков на скорость брожения сахарного раствора начальной концентрацией 10 % с 10 % по объему культуры молочнокислых бактерий. Видно, что размножение бактерий заканчивается в основном за 24 ч и плотность их популяции тем выше, чем больше внесено солодовых ростков по массе сахара. Интенсивное образование лактата также начинается в то время, когда в культуральной жидкости накапливается основная масса молочнокислых бактерий, но скорость накопления лактата отстает от скорости размножения бактерий.

Брожение продолжается без изменения численности молочнокислых бактерий и даже при некотором их уменьшении за счет

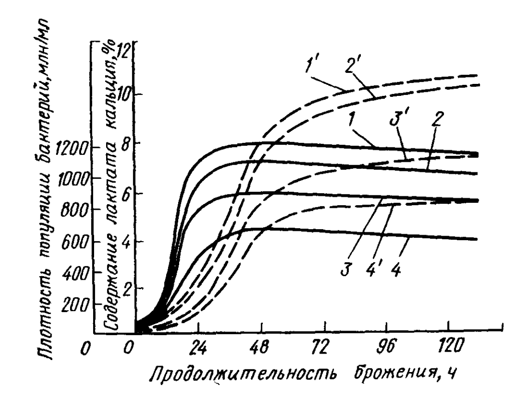


Рис. 53. Кинетика изменения плотности популяции молочнокислых бактерий (*1*—*4*) и образования лактата кальция (*1'*—*4'*) в зависимости от количества солодовых ростков на 100 г сахара:
1, 1' — 25 г; *2, 2'* — 20 г, *3, 3'* — 15 г; *4, 4'* — 10 г.

лизиса и автолиза. Отмечено, что к концу брожения содержание азота в культуральной жидкости несколько возрастает. При сбраживании среды, приготовленной в основном из сахара-сырца и рафинадной патоки, оптимальная норма ростков 15—20 % по массе сахара.

Существенное влияние оказывает количество засевной культуры. При сбраживании 10%-ных сахарных растворов с оптимальным содержанием ростков получены данные, приведенные в табл. 34 (см. также рис. 53). Из нее видно, что во время роста биосинтез молочной кислоты коррелирует с общим количеством молочнокислых бактерий. Чем больше бактерий, тем больше в единицу времени образуется лактата, но не пропорционально.

Таблица 34

Количество лактата, образовавшегося в среде (в %) за вычетом внесенного с засевной культурой[1]

Добавлено культуры бактерий, % по объему	Продолжительность брожения среды, сут					
	2	3	4	5	6	7
10	3,41	4,34	6,25	8,80	9,04	9,30
20	5,72	7,14	9,08	9,94	10,10	—
30	6,07	7,74	10,46	10,34	10,80	—
50	7,24	9,00	10,50	10,50	10,50	—

[1] В 1 мл засевной культуры содержалось 650 млн. клеток.

Влияние количества засевной культуры при брожении отъемно-доливным способом изображено на рис. 54 [30]. Кривая имеет максимум, соответствующий 25—30 % ее.

В зависимости от ряда условий числовое значение константы скорости брожения будет различным, но величина энергии активации, вычисленная с помощью уравнения Аррениуса для скорости химических реакций, останется примерно на уровне

4080 Дж·моль$^{-1}$. Средний температурный коэффициент в интервале 40—50 °C равен 2,4 [99].

Оптимальная температура для штаммов БДШ находится в указанных выше пределах, для других штаммов может быть несколько ниже, например 45 °C. Максимальная температура для штаммов БДШ — 54—56 °C. Понижение и повышение температуры против оптимальной ослабляет культуру. Кроме того, в первом случае появляется опасность заражения посторонней микрофлорой.

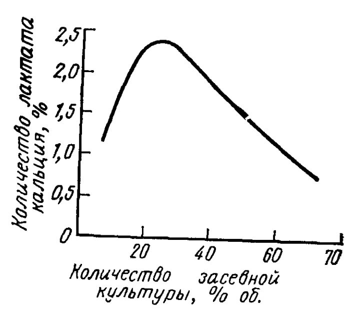


Рис. 54. Зависимость среднесуточного образования лактата кальция от количества засевной культуры молочнокислых бактерий при брожении отъемно-доливным методом.

Сбраживание 5%-ного раствора глюкозы, содержащего дрожжевой экстракт и минеральные соли, при температуре 45 °C L. delbrückii в стерильных анаэробных условиях [108] дало возможность получать зависимость скорости образования молочной кислоты $dP/d\tau$ от скорости роста биомассы $dN/d\tau$:

$$\frac{dP}{d\tau} = \alpha \frac{dN}{d\tau} + \beta N,$$

где α и β — коэффициенты, величина которых зависит от значения pH и находится по табл. 35. N выражена в единицах оптической плотности.

Таблица 35

Зависимость величины α и β от pH

pH	α	β	pH	α	β
6,0	2,2	0,55	5,2	2,45	0,26
5,6	2,2	0,49	4,8	3,0	0,14
5,4	2,2	0,32	4,5	3,55	0,11

Таким образом, была сделана попытка математического описания процесса накопления молочной кислоты как функции биомассы бактерий.

Очень важно, чтобы оптимальная величина pH поддерживалась постоянной с помощью автоматической подачи мелового молока.

ПОЛУЧЕНИЕ ЗАСЕВНОЙ КУЛЬТУРЫ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Пробирки с чистой культурой, получаемые от опытного завода ВНИИПрБ, вскрывают в боксе над пламенем спиртовой горелки, и культуру из каждой пробирки высевают в

три другие пробирки со свежеприготовленной питательной средой. После термостатирования первая из пробирок является музейной. Для сохранения активности чистой культуры ее пересевают на свежеприготовленную питательную среду зимой через каждые 10 суток, летом — через 5. Культуру из второй пробирки используют для разведения производственной культуры, из третьей — в качестве запасной.

Культуру из второй пробирки пересевают в 500-мл колбу, затем в бутыль вместимостью 10 л и, наконец, в культиватор. Объем засевной культуры должен быть до 30 % к рабочей вместимости бродильного аппарата. Температура культивирования 48—50 °С, продолжительность каждой стадии 20—24 ч. Первые две стадии проводят на питательной среде из солодового сусла, третью — из сусла и производственной среды (в соотношении 1 : 1) и последнюю — на производственной среде. Среды должны быть стерильными и в качестве добавки содержать стерильный мел (стерилизация воздухом при 150 °С) до pH 6,5

Показателем зрелости и активности культуры молочнокислых бактерий в каждой стадии размножения является плотность популяции (700—800 кл/мл), морфологические признаки и кислотообразующая активность. При микроскопировании клетки должны иметь морфологию, близкую к описанной на с. 199. Активная культура через 10—15 ч накапливает до 0,5 % молочной кислоты.

Если готовят засевную культуру для каждого бродильного аппарата, то делают отъем односуточной культуры из культиватора. На отечественных заводах чистую засевную культуру готовят только в начале производства и при необходимости ее замены. В дальнейшем засевной культурой служит отъем культуральной жидкости из предыдущего бродильного аппарата.

РЕЖИМ СБРАЖИВАНИЯ

Сбраживание проводят в аппаратах (чанах) цилиндрической формы со сферическими днищем и крышкой вместимостью 25—45 м^3, изготовленных из алюминия или нержавеющей стали. Хотя молочнокислое брожение — экзотермический процесс, удельное тепловыделение небольшое. Чтобы поддерживать заданную довольно высокую для брожения температуру, культуральную жидкость подогревают через змеевики. Во время брожения в них лучше подавать не пар, а горячую воду, не вызывающую сильного нагрева теплообменной поверхности. Бродильный аппарат снабжен барботером для подачи воздуха при перемешивании.

При переработке сахарного сырья питательную среду готовят непосредственно в бродильном аппарате, поэтому мелассу и рафинадную патоку после взвешивания направляют в него по трубопроводу самотеком. Сахар-сырец и часть рафинадной патоки растворяют в выше расположенной емкости и также сливают в

бродильный аппарат. К нему подведена коммуникация мелового «молока» (относительной плотностью 1,13—1,16), которое готовят в отдельной емкости. Кроме того, аппарат снабжен коммуникациями холодной воды и промывной воды от промывки меловых осадков и гипсового шлама. В нижней части бродильного аппарата установлены трубопроводы для слива культуральной жидкости и канализационный.

Аппарат наполняют на $^2/_3$ рабочей вместимости водопроводной водой или промывными жидкостями и в них растворяют мелассу и рафинадную патоку, исходя из необходимости получения концентрации сахара в растворе 3—4 %. Раствор нагревают до 70 °С и пастеризуют при этой температуре 1 ч. Затем раствор охлаждают до 48—50 °С, добавляют в него 15 % солодовых ростков к суммарной массе вводимого сахара, 20 % по вместимости бродильного аппарата засевной культуры молочнокислых бактерий, отобранной на вторые-третьи сутки из хорошо бродящей питательной среды в предыдущем или другом бродильном аппарате. Аппарат, из которого проведен отъем, доливают свежим сахарным раствором и продолжают брожение. Так как величина отъема довольно значительна, то начинающееся вскоре размножение резко сокращает продолжительность лаг-фазы.

Через 6 ч питательную среду начинают размешивать периодическим барботированием воздуха. Когда кислотность достигнет 0,5—0,6 %, считая на молочную кислоту (примерно через 1 сутки), добавляют меловое молоко с таким расчетом, чтобы и кислотность находилась в указанных выше пределах (с. 201). Обычно при ручной дозировке мел задают каждые 1,5—2 ч небольшими порциями. Перед подачей в бродильный аппарат мел должен быть хорошо измельчен, отсеян от комков и стерилизован. Проще стерилизовать меловое молоко острым паром (кипячение 20 мин). Количество воды, которое вводят с меловым молоком, учитывают при приготовлении питательной среды.

При отсутствии на заводе мела нейтрализацию молочной кислоты можно вести известковым молоком, но при этом нужно строго контролировать кислотность, так как раствор легко подщелочить, тогда как при нейтрализации мелом pH раствора устанавливается в слабокислой области независимо от количества заданного мела. Из уравнения реакции (с. 201) следует, что для нейтрализации 1 кг молочной кислоты нужно 0,55 кг химически чистого мела; 0,1 % молочной кислоты в 1 м^3 культуральной жидкости соответствует 1 кг молочной кислоты. При расчете количества добавляемого мела учитывают его чистоту, которая составляет 60—65 %. В результате нейтрализации образуется 120 % лактата кальция к массе сброженной гексозы, или 125 % к массе сброженного дисахарида.

При нормальном брожении за 1 сутки сбраживается до 2 % сахара, убыль его компенсируют добавлением в бродильный аппарат в несколько приемов 50%-ного раствора сахара-сырца или с добавкой в него рафинадной патоки, поддерживая концентрацию

сахара в бродящей среде на уровне 3—4 %. Вводят такое суммарное количество сахара, чтобы содержание лактата в культуральной жидкости в конце брожения было не более 15 %, а содержание несброженного сахара 0,2—0,5 %. Брожение продолжается 6—8 суток.

По окончании брожения аппараты моют горячей водой со щеткой, хлорной известью натирают внутреннюю и наружную поверхность аппарата, тщательно моют змеевик, хорошо ополаскивают аппарат холодной водой (несколько раз), затем набирают в него воды, нагревают ее до кипения и оставляют с нагретой водой 2—3 ч, после чего воду спускают. Моют также и коммуникации.

Во время брожения контролируют все основные параметры процесса. Если температура в бродильном аппарате упадет ниже 45 °С, неминуемо разовьется посторонняя микрофлора. В этом случае культуральную жидкость нагревают до 75 °С, пастеризуют 1 ч, снижают температуру до 50 °С и снова задают в нее чистую культуру или отъем из другого бродильного аппарата. При кратковременном повышении температуры сверх 55 °С резко снизится активность молочнокислых бактерий, поэтому в бродящую жидкость необходимо внести дополнительное количество активной культуры.

С целью получения в процессе брожения более чистого лактата раствор мелассы предварительно очищали катионитово-анионитовой сорбцией. Несмотря на то, что зола удалялась на 70—85 %, азотистые вещества на 58—70 %, красящие вещества на 70 % и летучие органические кислоты и коллоиды на 50—60 %, без проведения кристаллизации лактата качество молочной кислоты улучшить не удалось.

Молочную кислоту можно нейтрализовать карбонатами магния и цинка. Карбонат магния позволяет вдвое повысить концентрацию лактата в бродящей среде; соли цинка хорошо растворяются при 50 °С и практически нерастворимы в холодной воде Карбонаты обоих металлов очень дороги, цинк подавляет синтез молочной кислоты, для полноты его осаждения при разложении лактата необходимо применять H_2S в сильно разбавленном растворе.

Известно несколько способов непрерывного молочнокислого брожения, отдельные из которых предусматривают применение промежуточного ионообмена. Непрерывное брожение шло не более 7—10 суток, после чего развивалась сильная инфекция посторонними микроорганизмами [63].

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОЧИСТКА КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ

Культуральная жидкость содержит взвешенные частицы — мел, не вступивший в реакцию с молочной кислотой, нерастворимые примеси его, солодовые ростки и коллоиды. Отделить осадки, называемые в производстве меловыми, на фильтрующих аппаратах не удается из-за липкости шлама и небольшой скорости фильтрования. Поэтому культуральную жидкость в бродильном аппарате нагревают до 70 °С и нейтрализуют известковым молоком до слабо-розового окрашивания по фенолфталеину. При нейтрализации коагулируют белки, осаждается железо и разрушаются следы оставшегося сахара. Затем культуральную

жидкость отстаивают 6—12 ч при температуре не ниже 48 °С и, не взмучивая осадка, по прогретой паром коммуникации направляют на фильтрпресс или вакуум-фильтр, также прогретые паром, а фильтрат — в кристаллизатор лактата.

Меловой осадок заливают горячей водой (1 : 3) и тщательно перемешивают. После трехчасового отстаивания, не взмучивая осадка, первую промывную жидкость отделяют и добавляют к первому лактатному маточному раствору. К осадку в отстойнике присоединяют гипсовый шлам и также заливают горячей водой. Хорошо перемешанную суспензию фильтруют. Осадок выбрасывают, а вторую промывную жидкость используют для приготовления сахарсодержащей среды.

Фильтрование отстоявшейся культуральной жидкости не полностью освобождает ее от взвешенных примесей. Поэтому сначала на фильтре нарабатывают слой гипсового шлама, а в конце фильтрования оставшийся в нем раствор лактата отмывают водой и вытесняют воздухом.

На заводах ЧССР [96] культуральную жидкость после брожения нагревают до 90 °С и обрабатывают известью, например, 8,42 кг CaO на 1 м^3 жидкости. Оптимальную дозировку извести устанавливают для каждой культуральной жидкости, принимая за критерий скорость фильтрования. Такая обработка улучшает структуру осадка; избыток извести не является недостатком, так как кристаллизация лактата из нейтральной среды не имеет преимуществ перед щелочной. Однако обработка известью непригодна для недостаточно сброженных растворов (вследствие увеличения цветности при разложении сахара).

КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ ЛАКТАТА КАЛЬЦИЯ

Кристаллизация — мощный фактор очистки, поэтому во всех производствах, где она возможна, ею обязательно пользуются. Отечественная технологическая инструкция по производству пищевой молочной кислоты (1963 г.) временно на 1—2 года допускала непосредственное разложение лактата в культуральной жидкости. В связи с внедрением ионного обмена и сравнительно невысоких требований к качеству молочной кислоты освоение кристаллизации лактата задержалось на многие годы. Этому способствовало и то, что выход лактата кальция вследствие значительной его растворимости не превышает 35 %; следовательно, около $^2/_3$ его остается в маточном растворе, переработка которого связана с расходом пара, химических материалов, установкой дополнительного оборудования, с ухудшением качества продукта и переводом значительной части молочной кислоты в менее ценные сорта. При работе без кристаллизации лактата и применении ионного обмена все количество лактата (за исключением потерь) переходит в основной продукт, увеличивая таким образом выход пищевой молочной кислоты первого сорта.

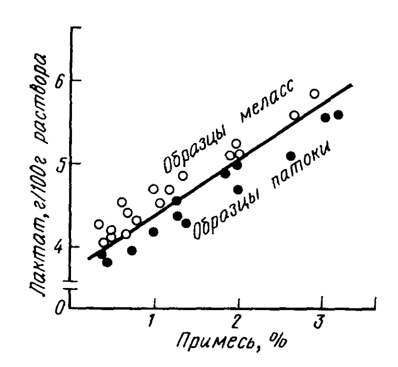


Рис. 55. Растворимость лактата кальция при 20 °С в зависимости от содержания примесей.

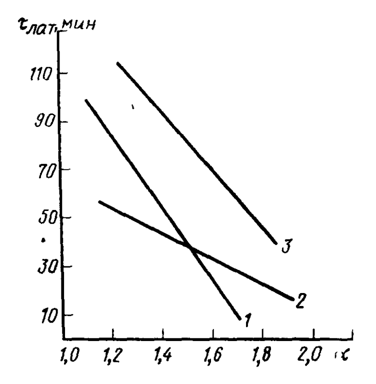
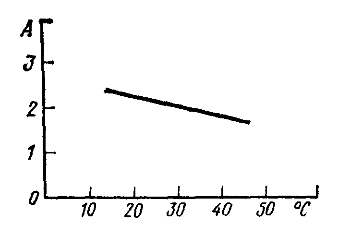
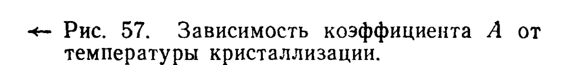


Рис. 56. Зависимость продолжительности индукционного периода от степени начального пересыщения (α):
1 — чистый раствор, 2 — паточный раствор, 3 — мелассный раствор





← Рис. 57. Зависимость коэффициента A от температуры кристаллизации.

Растворимость лактата кальция в воде[1] y приведена в табл. XIII приложения и увеличивается с повышением температуры t. При построении кривой $\lg y = f(t)$ она имеет точку перелома при температуре, близкой к 35 °С. В области температур 12—35 °С кривая описывается уравнением

$$y = 1{,}9 \exp(0{,}035t),$$

в области 40—80 °С

$$y = 1{,}4 \exp(0{,}0435t).$$

Растворимость лактата, определяемая по методу выкристаллизовывания его избытка в растворе, может быть установлена даже при интенсивном перемешивании лишь за 10 ч, что указывает на образование устойчиво пересыщенных растворов.

С увеличением содержания примесей растворимость лактата возрастает (рис. 55), но в неодинаковой мере в мелассном и паточном растворе (различие в характере примесей). В общем, с увеличением количества примесей на 1 % растворимость лактата возрастает в 1,1 раза.

В водном растворе молекула лактата кальция находится в гидратной форме и содержит пять молекул воды. Термографический

[1] Здесь и дальше растворимость и кристаллизация лактата кальция описаны на основании исследований [57].

анализ показал, что до 80 °C из лактата удаляется лишь адсорбционная влага. Кристаллизационная вода отщепляется при большей температуре и при 106 °C теряется 2,9 ее молекулы. При этом резко изменяется масса, что сопровождается эндотермическим эффектом.

Продолжительность индукционного периода τ_1 в зависимости от коэффициента начального пересыщения α, как и для лимонной кислоты, подчиняется линейному уравнению:

$$\lg \tau_1 = A + B \lg \alpha.$$

С увеличением α (рис. 56) τ_1 уменьшается, например, для чистых растворов при $\alpha = 1{,}3$ она равна 67 мин, при $\alpha = 1{,}69$ — 13 мин; для мелассных растворов — соответственно 109 и 68 мин. Иной характер эта зависимость носит в паточных растворах лактата: при $\alpha < 1{,}5$ скорость образования центров кристаллизации значительно возрастает, при $\alpha > 1{,}5$ — снижается по сравнению с чистыми растворами.

С повышением температуры при одинаковых значениях α продолжительность индукционного периода сокращается; коэффициент B в приведенном выше уравнении сохраняет постоянное значение, равное 3,126, значение коэффициента A уменьшается (рис. 57). Продолжительность этого периода находится в обратной зависимости от величины затравки (рис. 58) и интенсивности перемешивания (рис. 59).

Зависимость кинетической константы как реакции первого порядка от начального пересыщения приведена на рис. 60. Влияние температуры при различных начальных коэффициентах пересыщения:

$$K_{1,32} = 71{,}66 \exp\left(-\frac{2696}{T}\right); \qquad K_{1,42} = 5{,}825 \exp\left(-\frac{2033}{T}\right);$$

$$K_{1,57} = 1{,}525 \exp\left(-\frac{1509}{T}\right); \qquad K_{1,70} = 2{,}06 \exp\left(-\frac{1496}{T}\right),$$

где T — абсолютная температура, К.

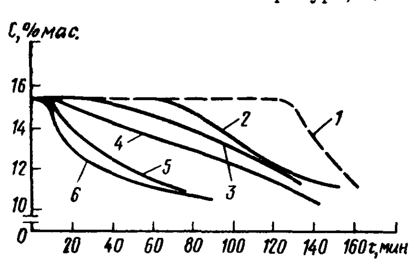


Рис. 58. Зависимость продолжительности индукционного периода при кристаллизации лактата кальция в присутствии затравочных кристаллов при температуре 20 °C:

1 — контроль; 2 — 0,05 %; 3 — 0,1 %; 4 — 0,5 %; 5 — 1 %; 6 — 3 %.

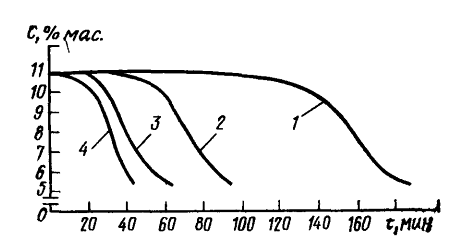


Рис. 59. Влияние частоты вращения мешалки (об/мин) на продолжительность индукционного периода:

1 — 100; 2 — 250; 3 — 350; 4 — 450.

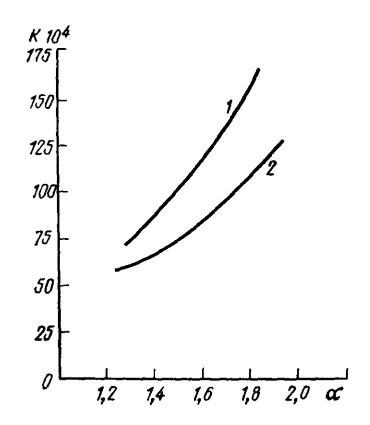


Рис. 60. Зависимость константы скорости кристаллизации лактата кальция от величины α для паточных (*1*) и мелассных (*2*) растворов.

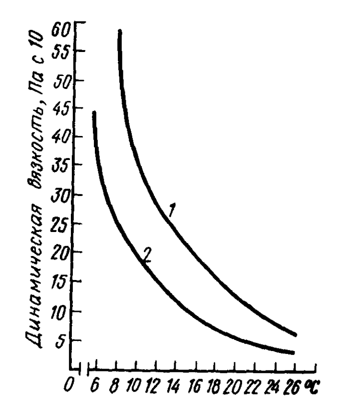


Рис 61 Вязкость утфелей лактата кальция, полученных при кристаллизации мелассных (*1*) и паточных (*2*) растворов.

Интенсивность перемешивания в интервале частоты вращения мешалки от 100 до 600 об/мин не влияет на скорость собственно кристаллизации.

Исходя из общетеоретических представлений, вязкость кристаллизующейся массы (утфеля) вследствие ухудшения тепло- и массообмена между жидкой и твердой фазами должна оказывать большое влияние на скорость роста кристаллов, их размер и отделяемость маточного раствора.

На рис. 61 показано изменение динамической вязкости производственных растворов лактата в процессе кристаллизации при снижающейся температуре (с 1 % затравки, перемешивании и $\alpha = 1{,}67$). Различие в вязкости мелассных и паточных растворов лактата объясняется различным содержанием примесей. При вязкости около 3 Па·с кристаллизация лактата из сброженных мелассных растворов сильно замедляется, поэтому для уменьшения вязкости в кристаллизатор необходимо добавить 10—15 % маточного раствора («раскачать» утфель). При кристаллизации из паточных растворов, как правило, этого делать не нужно.

Охлаждение растворов лактата в периоды зарождения центров кристаллизации и роста кристаллов проводят различными темпами. В первый час температуру снижают с 30 до 23 °С, в последующие 1,5 ч — с 23 до 18 °С. Когда будет достигнута эта температура, начинается массовая кристаллизация лактата. В этот период темп охлаждения замедляют до 2° в час до достижения конечной температуры 10 °С, которую в течение 3 ч поддерживают постоянной.

Начальная концентрация лактата должна находиться в пределах 14,5—15,5 % мас. При большей концентрации образование зародышей ускоряется, но замедляется их рост вследствие уве-

личивающейся вязкости утфеля. Оптимальной начальной температурой является 30 °С. При более низкой температуре значительно увеличивается индукционный период, а следовательно, и общая продолжительность кристаллизации. При этой же температуре вносится затравка в виде сырых кристаллов от предыдущей кристаллизации в количестве 6—7 % к массе кристаллизующегося раствора. Конечная температура не должна быть выше 10 °С (повышение ее на 5° снижает выход кристаллов на 12 %).

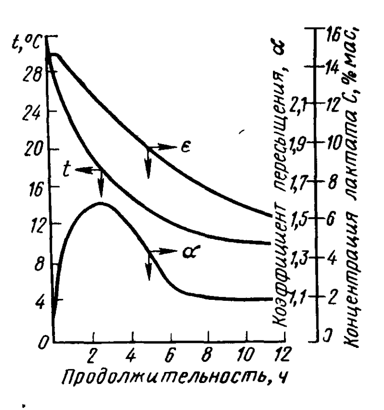


Рис. 62. График оптимального режима кристаллизации лактата кальция.

Общая продолжительность процесса кристаллизации — 10—12 ч. При оптимальном режиме кристаллизации (рис. 62) получают хорошо фугуемые утфели с игольчатыми кристаллами длиной 50—80 мкм [56].

Зная содержание лактата кальция в начальном и конечном (маточном) растворах в % мас., можно вычислить его выход (в безводном исчислении) К в процентах к массе раствора или $A_к$ в процентах к содержанию лактата в начальном растворе и количество маточного раствора М:

$$К = \frac{100\,(C_н - C_м)}{100 - C_м},$$

где $C_н$ — начальное содержание лактата в растворе, %; $C_м$ — содержание лактата в маточном растворе, %.

$$A_к = \frac{100\,(C_н - C_м)\,100}{(100 - C_м)\,C_н} = \frac{100K}{C_н}.$$

Например, при $C_н$=14,30 % и $C_м$=7,30 % получим К=7,55 %, $A_к$=52,79 %. Лактата в виде гидрата будет 10,67 %. Непробеленные кристаллы состоят из 30 % лактата и 70 % маточного раствора, их будет (10,67×100) : 30=35,56 %. Выход маточного раствора М=100 — 35,56=64,44 %.

При кристаллизации лактата кальция под воздействием ультразвука сильно сокращается латентный период, и продолжительность кристаллизации уменьшается в 6—8 раз, но кристаллы из-за появления большого количества центров получаются очень мелкими и маточный раствор плохо отделяется [66]. Добавление 0,5 % однопроцентного раствора полиэтиленимина к кристаллизуемому раствору лактата кальция повышает скорость кристаллизации на 25—30 %. При этом проявляются лишь флокулирующие свойства полиэтиленимина — понижается содержание примесей и цветность раствора [55].

Кристаллы лактата кальция отделяют от маточного раствора на фильтрпрессах, но лучше пользоваться центрифугами. Так как кристаллы имеют форму иголок, то отделение маточного раствора и пробеливание кристаллов идет хуже, чем лимонной кислоты. Выход пробеленных кристаллов лактата составляет около

80 % от их содержания в утфеле, доброкачественность кристаллов около 96 %.

При получении молочной кислоты высшего сорта кристаллы лактата кальция обычно не пробеливают. Из маточного раствора после разложения лактата, отделения гипса и осветления раствора активным углем вырабатывают молочную кислоту второго сорта.

РАЗЛОЖЕНИЕ ЛАКТАТА КАЛЬЦИЯ И ОТДЕЛЕНИЕ ГИПСОВОГО ШЛАМА

Лактат, выделенный из культуральной жидкости кристаллизацией или находящийся в ней в растворенном состоянии, разлагают серной кислотой. Разложение идет по реакции:

$$\underset{218}{(CH_3CHOHCOO)_2\,Ca} + \underset{98}{H_2SO_4} \rightarrow \underset{180}{2CH_3CHOHCOOH} + \underset{136}{CaSO_4}.$$

Сульфат кальция выделяется из раствора в виде бигидрата (гипса). Изотермы растворимости бигидрата сульфата кальция [46] в чистых растворах молочной кислоты различной концентрации приведены на рис. 63. С увеличением концентрации молочной кислоты растворимость гипса возрастает, при 10%-ной концентрации достигает максимума, затем снижается и при концентрации молочной кислоты около 40 % стабилизируется.

Растворимость гипса в производственных растворах молочной кислоты (рис. 64) отличается большей величиной и стабилизацией растворимости при меньших концентрациях молочной кислоты

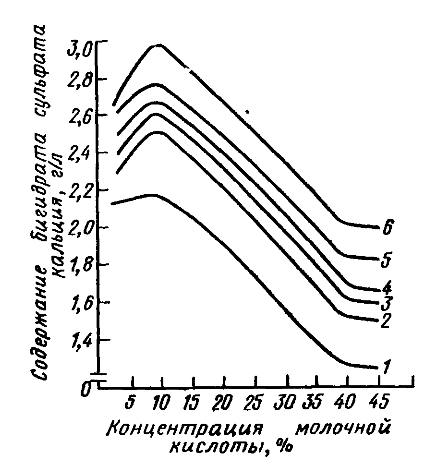


Рис. 63. Растворимость бигидрата сульфата кальция в чистых растворах молочной кислоты в зависимости от ее концентрации при температуре (°C):

1 — 20; 2 — 60; 3 — 70, 4 — 80; 5 — 90; 6 — 100

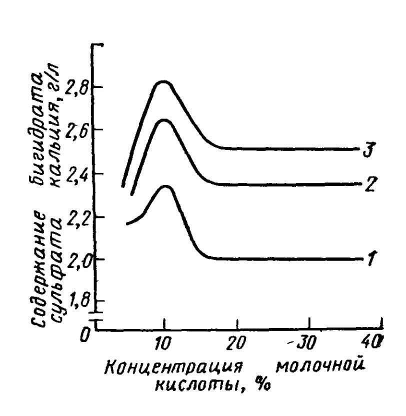


Рис. 64. Растворимость бигидрата сульфата кальция в производственных растворах молочной кислоты в зависимости от ее концентрации при температуре (°C):

1 — 20; 2 — 60; 3 — 80.

(20 %), что объяснено влиянием примесей. Растворимость гипса в растворах молочной кислоты в присутствии избытка серной кислоты, имеющей с гипсом одноименный ион, вначале убывает до концентрации серной кислоты 0,5 %, а затем с увеличением ее концентрации — возрастает.

Для получения крупнокристаллического хорошо фильтрующего осадка гипса необходимы следующие условия: коэффициент пересыщения им раствора 1,30—1,40; концентрация лактата кальция не выше 18 %, температура 80 °С, избыток серной кислоты 0,5 %, созревание кристаллов гипса 1 ч [46]. При увеличении концентрации лактата возрастает коэффициент пересыщения гипса, что приводит к возникновению многочисленных центров кристаллизации и получению мелких кристаллов, росту которых препятствует повышающаяся вязкость растворов. Повышение и понижение температуры уменьшает средний проектируемый радиус кристаллов гипса. Так как получающиеся в оптимальных условиях кристаллы гипса сравнительно крупны ($r_{ср}$ от $7{,}84 \cdot 10^{-3}$ до $9{,}60 \cdot 10^{-3}$ мм), то скорость фильтрования будет больше (в среднем в два раза) и вследствие меньшей удельной поверхности — меньше раствора молочной кислоты будет удерживаться осадком и снизится расход воды на промывку гипса на 40 %. Избыток серной кислоты затем нейтрализуют.

Концентрация лактата кальция в растворе после расплавления его кристаллов в ванне паром с добавлением жидкости от промывки гипса составляет 20—25 %. Полноту разложения лактата кальция контролируют с помощью цветной реакции с 0,1 %-ным раствором метилового фиолетового (при правильно проведенном разложении васильковое окрашивание, при избытке серной кислоты — зеленоватое, при избытке лактата — фиолетовое). Избыток серной кислоты или лактата устраняют добавлением соответственно лактата или серной кислоты.

Соединения железа осаждают гексацианоферроатом калия:

$$4FeL_3 + 3K_4[Fe(CN)_6] \rightarrow Fe_4[Fe(CN)_6]_3 + 12KL,$$

где L — анион молочной кислоты.

После разложения лактата калия серной кислотой образуется растворимый сульфат калия, увеличивающий зольность молочной кислоты на 0,3—0,4 %. Кроме того, сульфат калия имеет горький вкус и обладает послабляющим действием. Поэтому осаждение железа рекомендуется вести гексацианоферроатом кальция:

$$4FeL_3 + 3Ca_2[Fe(CN)_6] \rightarrow Fe_4[Fe(CN)_6]_3 + 6CaL_2.$$

Как и в предыдущей реакции, в лактат связывается 12 молекул молочной кислоты, но образующийся после разложения лактата кальция гипс мало растворим и отделяется от раствора при фильтровании. Полноту осаждения ионов железа проверяют с помощью того же реактива, избыток гексацианоферроата — с хлоридом железа. Тяжелые металлы и мышьяк осаждают сульфидом бария.

При расщеплении лактата непосредственно в культуральной жидкости процесс ведут так же. Гипсовый шлам отделяют и промывают на барабанных вакуум-фильтрах.

Для ускорения расчетов в производстве молочной кислоты пользуются таблицей XIV приложения [96].

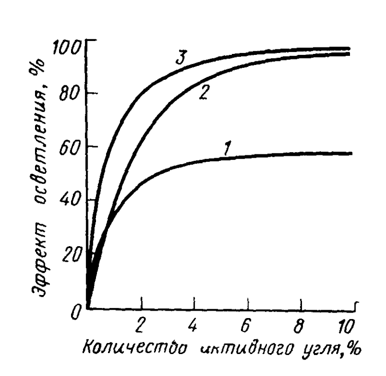


Рис 65 Эффект осветления растворов молочной кислоты в зависимости от дозировки активного угля при начальной оптической плотности (*D*):
1 — 0,570, *2* — 2,00; *3* — 3,00

ОСВЕТЛЕНИЕ РАСТВОРА МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

Раствор молочной кислоты, полученный без кристаллизации лактата кальция, осветляют после отделения гипсового шлама или в его присутствии.

Если раствор осветляют после отделения гипсового шлама, то оптимальными являются следующие условия [46]: температура 80 °С, продолжительность контакта раствора молочной кислоты с активным углем 30 мин. Эффект осветления углем марки ОУ-А показан на рис. 65. Он возрастает с увеличением дозы угля и повышением начальной цветности раствора. При отсутствии кристаллизации лактата оптимальной считается доза 3—4 % свежего угля к массе 40%-ной молочной кислоты.

При осветлении раствора молочной кислоты в присутствии гипса в конце разложения лактата в реактор добавляют весь активный уголь, частично отработавший на исправлении выпаренной молочной кислоты, и 0,5 % свежего активного угля (также к массе 40%-ной молочной кислоты). Уголь удаляют вместе с гипсовым шламом.

Активный уголь марки ОУ-А может быть заменен другой маркой (см. с. 171). Вместо обычного активного угля предложено применять уголь типа коллактивит, получаемый обугливанием древесных опилок и других растительных материалов концентрированной серной кислотой при температуре около 180 °С. При этом целесообразно совместить разложение лактата и осветление. Активный уголь, небольшое количество которого в этом случае используется для исправления молочной кислоты, предварительно отмывают от серной кислоты [46].

Цветность растворов молочной кислоты в основном зависит от цветности сырья, но в производстве во время выпаривания происходит и новообразование красящих веществ за счет протекания меланоидиновой реакции. Решающую роль при этом играет содержание азота (вид и количество аминокислоты). Растворы молочной кислоты, полученные из мелассных сред, осветляются хуже, чем из паточных. Еще хуже осветляются растворы молочной кислоты, выпаренные до 40%-ной концентрации.

ИОНИТОВАЯ ОЧИСТКА И ВЫПАРИВАНИЕ РАСТВОРА МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

Ионитовую очистку раствора молочной кислоты обычно применяют при отсутствии в схеме производства кристаллизации лактата, а также при получении кислоты, содержащей минимальную примесь минеральных веществ или их отдельных ионов. Для очистки молочной кислоты на отечественных заводах иониты были применены в 1950 г. [67]. При фильтрации через катионит в Н-форме и анионит в ОН-форме в результате ионообмена из раствора удаляются не только минеральные вещества, но частично молекулярно сорбируются красящие и азотистые вещества.

Ионирование растворов молочной кислоты и регенерацию ионитов в принципе ведут аналогично обработке растворов лимонной кислоты.

Растворы молочной кислоты концентрируют в горизонтальных вакуум-выпарных аппаратах. По-видимому, лучшим аппаратом следует признать «Центритерм», который очень быстро (за несколько секунд) выпаривает молочную кислоту без увеличения ее цветности. В горизонтальных вакуум-аппаратах выпаривание ведут при разрежении не менее 80 кПа и избыточном давлении греющего пара в пределах 100—150 кПа. Выпаривают кислоту с подкачиванием раствора до концентрации, несколько большей 40 %, в течение нескольких часов. При этом удаляется и значительная часть летучих кислот.

ИСПРАВЛЕНИЕ И РОЗЛИВ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

Качество выпаренной молочной кислоты корректируют. Если кристаллизацию лактата не проводят, процессы разложения лактата и осветления раствора молочной кислоты не разделяют, то при исправлении добавляют 5,5 % свежего активного угля по массе 40%-ной молочной кислоты. Уголь добавляют в горячую кислоту, продолжительность контакта — 30 мин. Если лактат кристаллизуют, уголь добавляют в раствор молочной кислоты, освобожденный от гипсового шлама, или в кислоту второго сорта, и количество угля для осветления устанавливают с таким расчетом, чтобы обеспечить нормы цветности для каждого сорта молочной кислоты.

Молочную кислоту еще раз проверяют на полноту разложения лактата, на содержание железа, тяжелых металлов и мышьяка. При превышении норм по этим показателям, приведенным в ГОСТ на молочную кислоту, ее исправляют так же, как описано на с. 215. Затем кислоту фильтруют на фильтрпрессе с деревянными фильтрующими элементами, покрытыми пищевой резиной, на зарубежных заводах — с фильтрующими элементами, выполненными из высокомолекулярных полиолефинов, и на фаянсовых нутч-фильтрах.

Частично отработавший уголь вместе с образовавшимися осадками направляют в реактор для разложения лактата, а прозрачную молочную кислоту — в разливочное отделение. При необходимости получения молочной кислоты большей концентрации проводят второе выпаривание. Готовую молочную кислоту перед розливом в тару выдерживают 2—10 суток.

При химической переработке теряется 7—10 % молочной кислоты от содержания ее в культуральной жидкости.

Разливают кислоту в стеклянные бутыли вместимостью 10 л, в бочки из полиэтилена высокого давления низкой плотности марки 10802-020 вместимостью 50 л, в автомобильные цистерны из титана марки ВТ1-0. Стеклянные бутыли закрывают жестяными лакированными крышками и укладывают в плотные деревянные ящики или деревянные ящики-клети. Промежутки между тарой и бутылью заполняют упаковочным материалом, обеспечивающим сохранность продукции.

Транспортную тару маркируют с нанесением манипуляционных знаков «Осторожно, хрупкое», «Верх, не кантовать» и следующих дополнительных обозначений: наименование предприятия-изготовителя и товарного знака, наименование продукта, сорта и концентрации, номера партии, даты изготовления, обозначения стандарта на данную кислоту.

Молочную кислоту транспортируют всеми видами транспорта с соблюдением правил, действующих на каждом виде транспорта. Кислоту хранят в таре изготовителя в закрытых складских помещениях. Гарантийный срок хранения — один год со дня выработки.

ХАРАКТЕРИСТИКА ГОТОВОЙ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

Согласно ГОСТ 490—79 пищевая молочная кислота выпускается 40%-ной концентрации и в зависимости от показателей качества — высшего, первого и второго сорта. Первый сорт кислоты получается без кристаллизации лактата и с проведением очистки активным углем и ионообменом. О получении молочной кислоты высшего и второго сорта — см. с. 214. Молочная кислота всех сортов — это прозрачная без мути и осадка густая жидкость со слабым, специфичным для молочной кислоты, запахом; кислого вкуса, без постороннего привкуса. Кислота не должна иметь неприятного запаха, обусловленного примесью летучих кислот.

По химическим показателям кислота должна соответствовать нормам, указанным в табл. 36. Для нужд фармацевтической промышленности выпускается небольшое количество кислоты по временным техническим условиям.

В США выпускают молочную кислоту четырех сортов: техническую, пищевую, пластическую и стандартную (по фармакопее США). Особенно высокие требования предъявляют к кислоте для пластмассовой промышленности; она содержит 50—85 % молочной кислоты, 1—2 % летучих кислот, не более 0,01 % золы, отсут-

Таблица 36

Химические показатели качества молочной кислоты

Показатели	Сорт		
	высший	первый	второй
Массовая доля общей молочной кислоты, %	40,0±1,0	40,0±1,0	40,0±1,0
То же, прямо титруемой молочной кислоты, %, не менее	37,5	37,5	35,0
То же, ангидридов, %, не более	2,5	2,5	5,0
Цветность, градусы, не более	6,5	10	30
Массовая доля золы, %, не более	0,6	1,0	4,0
То же, железа (Fe), %, не более	0,007	0,014	0,020
То же, мышьяка, мг/кг, не более	0,3	0,3	0,3
Соли тяжелых металлов	Должна выдерживать испытание		
Ферроцианиды	То же		
Цианистоводородная кислота	»		
Свободная серная кислота	»		
Массовая доля сульфатов (SO_4), %, не более	0,3	Не нормируется	
То же, хлоридов (Cl), %, не более	0,1	То же	
Барий	Не допускается	»	
Массовая доля редуцирующих веществ, %, не более	1,0	»	

ствуют обугливаемые вещества, сульфаты и хлориды; бесцветна и содержит только следы меди и железа. В пищевой молочной кислоте допускается содержание золы до 0,5 %, присутствие обугливаемых веществ, хлоридов, следы сульфатов и светло-соломенная окраска. Высший сорт отечественной молочной кислоты по ГОСТ 490—79 находится на уровне лучших образцов зарубежной пищевой кислоты, получаемой путем сбраживания сахарсодержащих отходов.

Очень важно иметь ясное представление о количестве ангидридов, содержащихся в молочной кислоте. Так как образование их сопровождается уменьшением числа свободных карбоксильных групп, а следовательно, и снижением кислотности, то присутствие ангидридов в товарной молочной кислоте нежелательно. Образование их — обратимая бимолекулярная реакция.

Исходя из этого можно записать следующее ее уравнение:

$$2C_3H_6O_3 \rightleftarrows C_6H_{10}O_5 + H_2O,$$

или сокращенно

$$2L \rightleftarrows P + H_2O.$$

По закону действия масс для установившегося динамического равновесия имеем

$$\frac{[L]^2}{[P][H_2O]} = K; \qquad P = \frac{[L]^2}{K[H_2O]},$$

где $[L]$ $[P]$, $[H_2O]$ — соответственно начальная общая концентрация молочной кислоты; равновесные концентрации ангидридов и воды; K — константа равновесия

С целью упрощения расчетов и приближения их к производственным выразим концентрации молочной кислоты в г на 100 г воды. Разделив числитель и знаменатель дроби, стоящей в левой части уравнения, на $[H_2O]^2$ и обозначив начальную общую концентрацию молочной кислоты $[L]/[H_2O]$ и концентрацию ангидридов $[P]/[H_2O]$ в процентах к массе воды соответственно через l и p, получим

$$K = l^2/p.$$

Пусть до образования ангидридов на 100 частей воды приходилось A частей молочной кислоты, после их образования осталось $AD/100$ частей молочной кислоты (где D — концентрация прямо титруемой молочной кислоты в пересчете на безводную кислоту в %). Следовательно, содержание ангидридов будет $A-(AD)/100$, или $A(1-D/100)$. Отсюда $l=(AD)/100$ и $p=A(1-D/100)$. Подставляя эти значения в уравнение для K, найдем

$$K = AD^2/[100(100-D)].$$

Содержание отдельных форм молочной кислоты при установившемся равновесии показано на рис 66 При этом содержание ангидридов x в общей концентрации молочной кислоты y будет [51]:

$$\lg x = 0{,}024653y - 0{,}9671.$$

Так как при прямом титровании определяется только половина карбоксильных групп лактилмолочной кислоты, то содер-

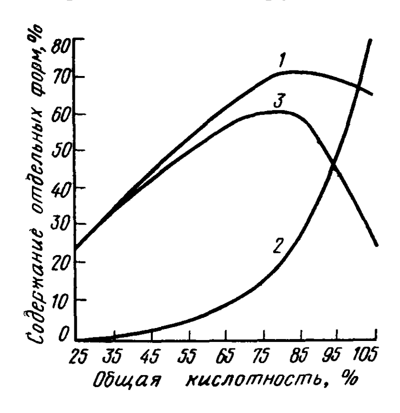


Рис 66. Соотношение отдельных форм молочной кислоты в зависимости от общей концентрации при установившемся равновесии:

1 — прямо титруемая; 2 — лактилмолочная, 3 — свободная.

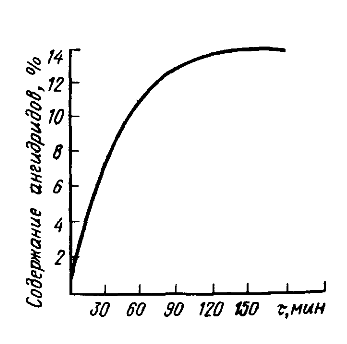


Рис 67 Образование ангидридов в растворе молочной кислоты 84,95 %-ной концентрации при температуре 100 °С.

жание ее в пересчете на молочную кислоту будет вдвое больше, чем ангидридов. Содержание ангидридов не пропорционально концентрации молочной кислоты, поэтому простой пересчет количества ангидридов с большей ее концентрации на 40%-ную невозможен, результат будет завышен.

Скорость образования ангидридов подчиняется уравнению реакции второго порядка, гидролиз ангидридов — уравнению первого порядка.

Для данной обратимой реакции справедливо дифференциальное уравнение скорости:

$$dx/d\tau = k_1(a-x)^2 - k_2 x,$$

где k_1 и k_2 — константы скорости соответственно образования ангидридов и их гидролиза как реакций второго и первого порядков; $a=A$; x — равновесная концентрация ангидридов, равная A (100—D)

После интегрирования этого уравнения и на основании экспериментальных данных определены кинетические константы k_1 и k_2 [51]. Поскольку константа равновесия не зависит от общей концентрации молочной кислоты, при прочих равных условиях не зависят от нее и константы k_1 и k_2, а следовательно, и время достижения равновесия. Найдено, что величина константы скорости гидролиза ангидридов в 2460 раз больше константы скорости их образования.

На рис. 67 показано образование ангидридов при температуре 100 °С. По сравнению с температурой 20 °С скорость реакции возросла в (70×24) : 3=560 раз, а конечное (равновесное) содержание ангидридов осталось без изменения. Даже трехчасового выпаривания, особенно до 40—45%-ной концентрации раствора, недостаточно для установления равновесного содержания ангидридов, поэтому процесс их образования будет продолжаться и во время хранения готовой молочной кислоты.

Серная кислота является сильным катализатором реакции образования ангидридов, не влияя на состояние равновесия. Определение ангидридов в присутствии редуцирующих сахаров завышает аналитические данные (каждый 1 % сахара пропорционален 0,9 % ангидридов).

ДРУГИЕ СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ОЧИСТКИ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

Запатентованы способы непрерывного сбраживания сахарсодержащих сред L delbrückii, иммобилизованных на матрице из полимера, составляющего набивку аппарата Активность бактерий сохраняется длительное время.

Известен способ получения молочной кислоты из культуральной жидкости, минуя образование лактата По мере сбраживания сахара кислоту выделяют при помощи электролиза с биполярными и ионитовыми мембранами (М. И. Федоткин). Технико-экономическая эффективность этого способа недостаточно изучена

Ионообмен можно использовать не только для очистки раствора молочной кислоты перед выпариванием, но и для разложения лактата кальция (Н-катионит), для извлечения и концентрирования молочной кислоты (ОН-анионит).

Концентрирование молочной кислоты достигается также образованием толуолом, бензолом и другими веществами с водой азеотропных смесей, кипящих и отгоняемых при температуре ниже температуры кипения кислоты.

Очистка молочной кислоты от примесей экстракцией эфирами, плохо растворимыми в воде спиртами и другими органическими растворителями и их смесями эффективна только из ее концентрированных растворов (не ниже 70 % мас.). Получение таких растворов разложением кристаллического лактата кальция концентрированной серной кислотой невозможно, так как лактат содержит около 30 % кристаллизационной воды и не меньше поверхностной влаги. Для сушки сырого лактата надо затрачивать тепло, терять часть лактата в результате разложения и, возможно, загрязнять его.

Для получения концентрированных растворов молочной кисоты И. П. Захаров и К. И. Зыкова предложили переводить кальциевый лактат в натриевый с помощью обменной реакции с сульфатом или карбонатом натрия:

$$Ca(C_3H_5O_3) + Na_2SO_4 \rightarrow \underline{CaSO_4} + 2NaC_3H_5O_3$$

Во втором случае образуется карбонат кальция, полнее удаляющий из раствора ионы кальция. Гипс (или мел) отфильтровывают. Натриевый лактат при высоких концентрациях — сиропообразная легко концентрирующаяся жидкость. Выпаренный раствор лактата натрия разлагают концентрированной серной кислотой, молочную кислоту несколько раз экстрагируют эфиром, эфирный экстракт отделяют и эфир отгоняют. При разложении натриевого лактата вновь образуется сульфат натрия, который кристаллизуют и возвращают в начало процесса.

При трех экстракциях этим способом можно получить очень чистую молочную кислоту концентрацией 80—95 % с выходом около 85 %. Расходуется меньше пара, чем на предварительное концентрирование раствора молочной кислоты, но кислота все же имеет примесь растворителя, реакция превращения кальциевого лактата в натриевый с сульфидом натрия не идет до конца, экстракция затруднена побочными явлениями, велики потери молочной кислоты.

На некоторых зарубежных заводах молочную кислоту очищают экстрагированием изопропиловым эфиром в аппаратах непрерывного действия в противоточной системе.

Перегонка молочной кислоты с водяным паром под вакуумом — один из старых способов, применяющихся за рубежом. Молочная кислота стекает в аппарате по конической сетке, на которую подают пар, перегретый до 200 °С. Способ мало эффективен: выход высококачественной кислоты около 80 % (при перегонке 50 %-ной молочной кислоты); часть ее разлагается во время перегонки, вместе с примесями образуя черную дегтеобразную массу, не имеющую большой ценности; дистилляты имеют запах пригара.

Очистка молочной кислоты путем этерификации заключается в том, что в результате химического взаимодействия молочной кислоты и спирта (метилового, этилового и др.) образуется соответствующий эфир, который отгоняют для отделения от примесей, а затем гидролизуют, регенерируя молочную кислоту и спирт. Спирт укрепляют в ректификационной колонне под атмосферным давлением и возвращают на этерификацию, а молочную кислоту выпаривают под разрежением. Обычно этерификации подвергают неочищенную молочную кислоту и для предупреждения превращения балластных веществ в смолообразную трудно удаляемую массу кислоту разбавляют вдвое. Катализатором этерификации служит серная кислота.

Можно исходить и из непробеленного лактата. Добавляемая серная кислота разлагает лактат и освободившаяся молочная кислота тут же этерифицируется спиртом.

Все эти методы очень усложняют технологию, пожаро- и взрывоопасны, поэтому применяются редко и только на некоторых зарубежных заводах.

Химические способы предусматривают окисление примесей молочной кислоты героксидом водорода, перманганатом калия и азотной кислотой; очистку активным углем в сочетании с окислителями. При этом происходит снижение цветности и одновременное окисление молочной кислоты до уксусного альдегида и пировиноградной кислоты, вследствие чего содержание молочной кислоты в готовом продукте снижается на 2—2,5 %.

Очистка молочной кислоты одним активным углем мало эффективна.

Глава 10. ТЕХНОЛОГИЯ ВИННОЙ КИСЛОТЫ

ВИННОКИСЛОТНОЕ СЫРЬЕ

Сырьем для производства винной кислоты в настоящее время являются только виннокислая известь (ВКИ) и гидротартрат калия (винный камень). ВКИ получается при переработке выжимки, осадочных дрожжей, барды (винасса) при отгонке коньячного спирта из виноматериалов, промывных вод при мойке тары на заводах первичного виноделия. Винный камень выпадает в молодом вине при обработке его холодом и при концентрировании виноградного сока в вакуум-аппаратах.

По ОСТ 18-82—72 Минпищепрома СССР «Сырье виннокислотное» в зависимости от качественных показателей подразделяется на два сорта: первый и второй. По внешнему виду ВКИ — кристаллический легко рассыпающийся порошок, от белого до пепельного цвета, без следов плесени и гнили. ВКИ разлагается микроорганизмами, особенно в недосушенном состоянии, что приводит к потере винной кислоты. Сыпучесть сохраняется при относительной влажности воздуха до 80 %. При более высокой влажности цвет становится коричневым. Винный камень — кристаллы с включением виннокислой извести, дрожжей, красящих веществ и других механических примесей.

По физико-химическим показателям ВКИ и винный камень должны удовлетворять требованиям, указанным в табл. 37. Перед высушиванием ВКИ должна быть промыта не менее двух раз, винный камень — не менее одного раза. Нерастворимые примеси представлены в основном клетчаткой. Коэффициент загрязнения — это отношение количества соединений железа и алюминия к количеству винной кислоты в сырье, выраженное в процентах.

Таблица 37

Характеристика ВКИ

Показатели	Виннокислая известь		Винный камень	
	сорт 1	сорт 2	сорт 1	сорт 2
Влажность, %, не более	3	3	1	2
Содержание винной кислоты, %, не менее	48	40	60	50
Содержание нерастворимых примесей, %, не более	8	15	3	10
Коэффициент загрязнения, %, не более	2	3	1	2
Реакция	Нейтральная	Нейтральная	Кислая	Кислая

Сырье упаковывают в прочные льно-джуто-кенафные мешки и непропитанные крафтмешки массой нетто до 60 кг. Мешки плотно зашивают шпагатом. На каждом мешке или пришитом к нему матерчатом (деревянном) ярлыке не-

смываемой краской ставят штамп со следующими обозначениями наименование, местонахождение и подчиненность предприятия-изготовителя, наименование и сорт виннокислотного сырья, номер партии, время выработки сырья, масса нетто и брутто в кг, дата отгрузки, номер настоящего ОСТ

Транспортируют сырье в закрытых автомашинах, железнодорожных вагонах и контейнерах Хранят в сухом помещении (относительная влажность не выше 75 %) на деревянном или асфальтовом полу. Гарантийный срок хранения сырья — 6 месяцев со дня выпуска с предприятия-поставщика.

ПОДГОТОВКА ВИННОКИСЛОТНОГО СЫРЬЯ

От товарной ВКИ отмывают чистой холодной водой примеси хлоридов, сульфатов калия и натрия, соединений железа, алюминия, красящих и других веществ. Для этого ВКИ суспендируют в холодной воде, хорошо перемешивают и отделяют на нутч-фильтрах, барабанных фильтрах под разрежением, на фильтрующей центрифуге ТВ-600, непрерывнодействующей отстойной центрифуге со шнековой выгрузкой осадка типа НОГШ-325 или ФПАК-М. Промывная вода идет в канализацию.

На нутч-фильтрах и барабанных фильтрах поддерживают разрежение 53—67 кПа, причем на первых создают его постепенно. Осадок промывают небольшими порциями воды, по 25 % к объему осадка. Промывку ВКИ на барабанных вакуум-фильтрах и центрифугах типа НОГШ осуществляют двухступенчато с репульпацией осадка. Промывку контролируют рефрактометрически и прекращают при снижении коэффициента преломления воды до 1,335.

Винный камень-сырец измельчают на размольной установке (дисковая дробилка, жернова, шаровая мельница) до частиц размером 0,1—0,3 мм и перерабатывают в ВКИ.

Из винного камня получают ВКИ «нейтральным» способом — с хлоридом и карбонатом (гидроксидом) кальция:

$$2KHC_4H_4O_6 + CaCl_2 \rightarrow \underline{CaC_4H_4O_6} + H_2C_4H_4O_6 + 2KCl;$$

$$H_2C_4H_4O_6 + CaCO_3 \rightarrow \underline{CaC_4H_4O_6} + H_2O + CO_2,$$

или

$$H_2C_4H_4O_6 + Ca(OH)_2 \rightarrow \underline{CaC_4H_4O_6} + H_2O.$$

Если реакцию обменного разложения вести только одним хлоридом кальция, то из раствора осаждалась бы только половина винной кислоты, а вторая половина ее оставалась бы в растворе свободной. И наоборот, если вести разложение только одним карбонатом (гидроксидом) кальция, то из раствора осаждалась бы также половина винной кислоты, а вторая половина была бы в виде растворенной средней калиевой соли:

$$2KHC_4H_4O_6 + CaCO_3 \rightarrow CaC_4H_4O_6 + K_2C_4H_4O_6 + CO_2 + H_2O;$$

$$2KHC_4H_4O_6 + Ca(OH)_2 \rightarrow CaC_4H_4O_6 + K_2C_4H_4O_6 + H_2O.$$

Средние соли калия и натрия мелом и известью не осаждаются.

Суммарное уравнение реакции:

$$2KHC_4H_4O_6 + CaCl_2 + CaCO_3 \rightarrow 2CaC_4H_4O_6 + 2KCl + CO_2 + H_2O.$$

Ввиду малой растворимости винного камня реакцию ведут при нагревании и при концентрации его, оптимальной для выхода ВКИ (при большей концентрации выход снижается).

Заполнив реактор на 50 % полезной емкости промывной водой от промывки гипсового шлама, при работающей мешалке загружают винный камень из расчета 80—90 кг на 1 м^3 объема. Массу нагревают до 75—80 °С и добавляют сначала хлористый кальций, а затем меловое или известковое молоко. Приливание мелового молока ведут медленно во избежание сильного вспенивания массы выделяющимся диоксидом углерода.

Хлорид кальция употребляют плавленый (твердый) I сорта с содержанием не менее 67 % $CaCl_2$ или жидкий I сорта с содержанием не менее 38 % $CaCl_2$. Для полноты осаждения ВКИ хлористый кальций и мел добавляют с небольшим избытком. Наличие его проверяют качественными пробами: в первом случае при добавлении к фильтрату 10%-ного раствора щавелевокислого аммония должен появиться осадок оксалата кальция, во втором — при добавлении соляной кислоты к нефильтрованной суспензии должно слышаться слабое шипение. Обычно избыток мела колеблется в пределах 0,1—0,2 % от теоретически необходимого количества.

По окончании разложения винного камня (3—3,5 ч) размешивание продолжают еще полчаса и после вторичной контрольной проверки его прекращают и суспензию направляют на фильтры для отделения и промывки ВКИ.

РАЗЛОЖЕНИЕ ВИННОКИСЛОЙ ИЗВЕСТИ И ОТДЕЛЕНИЕ ГИПСОВОГО ШЛАМА

Винную кислоту выделяют из ВКИ разложением серной кислотой: $CaC_4H_4O_6 + H_2SO_4 \rightarrow C_4H_6O_6 + CaSO_4$.

Разложение ведут в реакторе, выполненном из кислотоупорной стали, снабженном мешалкой (n=60 об/мин), хорошей вентиляцией и паровым барботером. Вначале при работающей мешалке в реактор подают промывную воду, полученную от промывки гипсового шлама, отработавший активный уголь и затем осторожно серную кислоту плотностью 1,80—1,84 (улучшенного качества, марки А, не содержащую мышьяка).

Реакционную массу нагревают до температуры 85—90 °С и постепенно небольшими порциями по 15—20 кг загружают ВКИ. При значительном повышении вязкости массы вследствие выкристаллизовывания гипса в виде бигидрата добавляют дополнительное количество промывной воды, заполняя реактор не более чем на 70 %. ВКИ загружают в реактор до тех пор, пока содержание серной кислоты в растворе не понизится до 0,1—0,2 %. Нельзя

допускать полной нейтрализации свободной серной кислоты и наличия избытка ВКИ, иначе гипс получится мелкокристаллическим, будет плохо фильтроваться и промываться, а также содержать неразложенную ВКИ. Избыток кислоты в конце процесса расщепления нейтрализуют мелом

Полноту разложения ВКИ и наличие избытка серной кислоты определяют по величине pH, которая в конце реакции должна равняться 1,5. Кроме того, проводят пробу с хлоридом кальция (пол-пробирки фильтрата кипятят с 2 мл 10%-ного раствора хлорида кальция, после охлаждения должен выпасть осадок гипса высотой не менее 5—6 мм).

После разложения перемешивание продолжают еще 30—40 мин, снова проверяют наличие избытка серной кислоты и при положительной пробе передают реакционную массу на фильтрование Плотность раствора винной кислоты после разложения ВКИ должна быть не ниже 1,06.

При разложении ВКИ серной кислотой и в последующих процессах большое влияние на величину потерь, окраску растворов и кристаллов винной кислоты оказывает примесь железа. Комплексные соединения железа с винной кислотой хорошо растворимы и окрашивают раствор винной кислоты в желтый и бурый цвет. Присутствие в растворе железа, алюминия и серной кислоты приводит к изомеризации L-винной кислоты, изомеры в процессе производства не выкристаллизовываются и являются потерей.

Сернокислое окисное железо начинает влиять на изомеризацию при содержании его в растворе более 2 % (в пересчете на железо). Количество образовавшихся изомеров в зависимости от длительности нагревания при 80 °C (10—50 ч) возрастает с 2,8 до 17,9 %. Оно возрастает также с увеличением начального содержания железа в растворе. Количество образующихся изомеров зависит и от начального содержания серной кислоты, но не зависит от времени (при 0,5 % H_2SO_4 2,8 % изомеров, при 1 % H_2SO_4 — 3,8 % и при 2 % — 4,8 %). Поэтому в производстве нужно строго контролировать содержание окисного железа в сырье и серной кислоты в растворах, максимально сокращать длительность производственного цикла [21].

Гипсовый шлам отфильтровывают и промывают горячей водой температурой не ниже 80 °C до содержания винной кислоты в шламе не более 0,02 %. На промывку расходуют от 12 $м^3$ (при стандартной ВКИ, поступающей в производство) до 18 $м^3$ (при нестандартной) на 1 т винной кислоты. Отмывка гипсового шлама при переработке нестандартной извести занимает в 2—3 раза больше времени.

ВЫПАРИВАНИЕ И ОЧИСТКА РАСТВОРОВ ВИННОЙ КИСЛОТЫ

Растворы винной кислоты выпаривают дважды под разрежением, сначала до плотности 1,3, а затем до 1,42 (при 75 °C) с промежуточной очисткой их гексацианоферроатом

калия (лучше — кальция), сульфидом бария и активным углем. Применение гексацианоферроата калия здесь нежелательно по той причине, что из каждой его части образуется четыре части труднорастворимого на холоду гидротартрата калия, который нужно отделять, так как, попадая в готовую продукцию, он настолько повышает ее зольность, что нередко делает нестандартной:

$$2Fe_2(C_4H_4O_6)_3 + 3K_4[Fe(CN)_6] + 6H_2C_4H_4O_6 \rightarrow 12KHC_4H_4O_6 + Fe_4[Fe(CN)_6]_3.$$

Кроме того, гидротартрат калия необходимо вновь перерабатывать в ВКИ.

При выпаривании раствора винной кислоты вследствие концентрирования выпадает в осадок основная масса растворенного гипса, который удаляют вместе с угольным шламом. Для очистки растворов расходуют около 2 % активного угля к массе винной кислоты. Продолжительность контакта — 30—40 мин при температуре 65 °С.

После удаления гипса, выпавшего при первом выпаривании, угля и других примесей фильтрацией (с промывкой) раствор винной кислоты очищают от гидротартрата калия в емкости с мешалкой, постепенно снижая температуру до 15—20 °С; при конечной температуре выдерживают 30 мин и затем фильтруют. Общая продолжительность кристаллизации гидротартрата калия около 2,5 ч [49].

Этот камень называют оборотным, так как он поступает для получения ВКИ.

Растворимость винного камня в производственных растворах по сравнению с водой возрастает, что характеризуется данными, приведенными в табл. 38, и может быть вычислена по уравнению [49]:

$$C_0 = 7{,}9072 - 0{,}3952t + 0{,}038t^2 + 0{,}00052t^3 + 29\cdot10^{-7}t^4.$$

Таблица 38

Растворимость винного камня в производственных растворах

Температура, °С	Содержание $KHC_4H_4O_6$, г/л	Температура, °С	Содержание $KHC_4H_4O_6$, г/л	Температура, °С	Содержание $KHC_4H_4O_6$, г/л
10	7,26	37	24,18	70	56,00
13	8,13	40	26,76	75	62,20
16	9,36	43	29,39	80	69,34
19	10,91	46	32,05	85	77,64
22	12,71	49	34,76	90	87,45
25	14,73	52	37,52	95	99,06
28	16,92	55	40,33	100	112,96
31	19,24	60	45,18		
34	21,67	65	50,34		

ДАЛЬНЕЙШАЯ ПЕРЕРАБОТКА РАСТВОРА И ПОЛУЧЕНИЕ КРИСТАЛЛИЧЕСКОЙ КИСЛОТЫ

Раствор винной кислоты после второго выпаривания кристаллизуют. Растворимость винной кислоты в производственных растворах зависит от содержания и соотношения различных примесей. При содержании их до 10 % к массе винной кислоты она равна или немного ниже растворимости винной кислоты в воде. По мере дальнейшего накопления примесей растворимость повышается до 1,08—1,16 [27, 47].

Вязкость растворов винной кислоты в воде приведена в табл. 39 [15].

Таблица 39

Вязкость растворов винной кислоты[1]

Концентрация винной кислоты в растворе, моль/л	Температура, °С								
	20	30	40	50	60	70	80	90	100
0,33	1,1334	0,9165	0,7549	0,6482	0,5453	0,480	0,428	0,370	0,334
0,67	1,2743	0,0206	0,8413	0,7020	0,5984	0,520	0,462	0,406	0,370
1,33	1,5540	0,2863	1,0365	0,8642	0,7309	0,600	0,530	0,480	0,430
2,00	1,9165	1,6969	1,3533	1,1088	0,9343	0,720	0,630	0,550	0,490
2,67	2,6500	2,1827	1,7182	1,3877	1,1559	0,830	0,700	0,610	0,510
3,33	5,3299	3,8304	2,9334	2,3066	1,8724	1,230	0,995	0,875	0,850

[1] При температуре 20—60° С — динамическая (Па·с), при 70—100° С — кинематическая ($\nu \cdot 10^6$ $м^2 \cdot с$).

Раствор винной кислоты кристаллизуют в периодически действующих кристаллизаторах с мешалкой, постепенно снижая температуру с 70 до 14—15 °С, например, при кристаллизации основного раствора так: в первый час на 15°, во второй на 10°, в третий — пятый на 4° и начиная с шестого часа и до конца — на 3,5°. Кристаллизация длится около 10 ч.

Так как винная кислота кристаллизуется без гидратной воды, то ее раствор можно выпаривать до образования некоторого количества кристаллов в вакуум-выпарном аппарате. Один из вариантов предусматривает выпаривание растворов при температуре 65—70 °С до выпадения 10 % кристаллов и последующее охлаждение в течение 6 ч до 26—22 °С. Охлаждение в первые два часа ведут со скоростью 15 °/ч, в каждый следующий час — со скоростью соответственно 7; 5; 2,5 и 2°. Выход кристаллов составляет 48—50 %.

Утфель центрифугируют на периодически действующих подвесных центрифугах в начале (во время загрузки утфелем) при частоте вращения ротора около 300 об/мин, а затем при полных оборотах. После отделения маточного раствора кристаллы винной

кислоты промывают холодной водой и заканчивают центрифугирование при полном прекращении вытекания из ротора светлой промывной воды.

Сырые кристаллы винной кислоты влажностью около 2 % сушат горячим воздухом при температуре не выше 60 °С во вращающейся барабанной сушилке или в сушилках других типов.

В производстве винной кислоты наиболее целесообразной считают четырехпродуктовую схему. Второй и третий маточные растворы осветляют активным углем, первый и все последующие — выпаривают, кристаллизуют, центрифугируют и кристаллы промывают водой. Четвертый маточный раствор направляют для осаждения винной кислоты известью и получения ВКИ.

Потери винной кислоты составляют: при получении ВКИ из винного камня около 15 %, при получении винной кислоты из ВКИ — около 21 % от содержания кислоты в сырье. Например, при использовании в качестве сырья кондиционной ВКИ расход его в пересчете на 100%-ное виннокислотное сырье на 1 т винной кислоты составит 1265 кг. С учетом коэффициента загрязнения (с. 223) отчетный расход сырья будет меньше и корректируется по нижеследующей формуле:

$$x = \frac{DC}{100}\left(1 - \frac{B}{100}\right)\left(1 - \frac{K}{100}\right),$$

где x — количество винной кислоты в безводном сырье с учетом коэффициента загрязнения, кг; D — масса сырья в натуре, кг, B — влажность сырья, %; C — содержание винной кислоты в сырье, определенное химическим анализом, %; K — коэффициент загрязнения, %.

Винная кислота (ГОСТ 21205—83) — бесцветные кристаллы различного размера или белый порошок; для кислоты I сорта допускается желтоватый оттенок. Раствор (2%-ный) в дистиллированной воде должен быть прозрачным, не содержать механических примесей и не иметь запаха. По химическим показателям винная кислота должна соответствовать нормам, указанным в табл. 40.

При получении винной кислоты большей чистоты или определенного размера кристаллов ее перекристаллизовывают при соответствующем режиме (при необходимости классифицируют на ситовых аппаратах).

Винную пищевую кислоту упаковывают: в бумажные непропитанные и ламинированные трех-, четырехслойные мешки массой нетто не более 30 кг; в льно-джуто-кенафные мешки с вискозными нитями не ниже II категории массой нетто не более 40 кг. При отгрузке мелкими отправками кислоту допускается упаковывать в дощатые неразборные ящики для продукции пищевой промышленности массой нетто не более 30 кг. При упаковке в мешки и ящики допускаемое отклонение от массы не более ±0,5 %.

При упаковке кислоты в бумажные и тканевые мешки внутрь мешка должен вставляться мешок-вкладыш из полиэтиленовой нестабилизированной пленки марки Н толщиной 0,1 мм. Полиэтиленовые мешки-вкладыши после заполнения их кислотой должны быть герметически закрыты путем сварки или заклеивания полиэтиленовой лентой.

Таблица 40

Характеристика винной кислоты

Показатели	Нормы для сорта	
	высшего	первого
Идентификация винной кислоты	Выдерживает анализ	
Содержание винной кислоты, %, не менее	99,0	99,0
Содержание, %, не более		
золы	0,3	0,5
свободной серной кислоты	0,03	0,05
меди	0,00010	0,00036
Проба на свинец с сероводородом	Выдерживает анализ	
Содержание мышьяка, %, не более	0,00007	0,00014
То же, хлоридов, %, не более	0,01	0,02
Проба на оксалаты с уксуснокислым кальцием	Выдерживает анализ	
То же, на барий с серной кислотой	То же	
То же, на ферроцианиды с хлорным железом	»	
Содержание сульфатов, %, не более	0,20	0,40

Верхние швы бумажных и тканевых наружных мешков должны быть зашиты машинным способом льняными нитками. Дощатые ящики перед упаковкой кислоты должны быть выстланы подпергаментом, полностью покрывающим всю внутреннюю поверхность тары (включая и верх) без каких-либо зазоров или промежутков.

Маркирование транспортной тары проводят с нанесением предупредительного знака «Боится сырости» и следующих дополнительных обозначений: наименования и товарного знака предприятия-изготовителя, наименования продукта и его сорта, номера партии, даты выработки, обозначения настоящего стандарта.

Пищевая винная кислота транспортируется в не имеющих постороннего запаха крытых железнодорожных вагонах, контейнерах, автомашинах, а также водным и воздушным транспортом с соблюдением правил, действующих на каждом виде транспорта. Хранить ее следует в упакованном виде в помещении на деревянных стеллажах или поддонах при относительной влажности воздуха не более 65 %.

Гарантийный срок хранения винной кислоты — 12 месяцев со дня выработки.

ЧАСТЬ

4

ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНАЯ

Глава 11. УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ И ХАРАКТЕРИСТИКА СТОЧНЫХ ВОД

ОТХОДЫ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

При получении пищевых органических кислот образуются отходы: в производстве лимонной кислоты — отработавший мицелий A. niger, цитратный фильтрат, гипсовый шлам; в производстве молочной кислоты — меловые осадки, гипсовый шлам; в производстве винной кислоты — гипсовый шлам. Таким образом, наряду с целевыми продуктами получается некоторое количество отходов, например, в производстве лимонной кислоты на 1 т кристаллической кислоты — около 14 т (в натуральном исчислении). Эти отходы в основной массе пока не используются и загрязняют окружающую среду. Для освобождения от них приходится затрачивать значительные средства.

Отработавший мицелий

На 1 т лимонной кислоты получается 0,16—0,23 т мицелия (в безводном исчислении). Влажность 65—75 %. Химический состав мицелия приведен ниже (табл. 41).

Подробнее состав мицелия рассмотрен на с. 69. Кроме того, он содержит в значительных количествах ферменты — инвертазу, инулазу, амилазу, пектиназу, цитазу, протеазу, танназу, глюкозооксидазу и другие. В зависимости от тщательности извлечения

Таблица 41

Химический состав мицелия (% на сухую массу)

Компоненты	Мицелий	
	глубинный	поверхностный
Органические вещества	75—80	92—96
Минеральные вещества (зола)	20—25	4—8
Моносахариды и сахароза	0,38—0,42	0,44—0,47
Полисахариды	13—20	15—18
Сырой протеин	25—32	18—25
в том числе белок и хитин	10—16	15—18
Стеролы	0,20—0,30	0,35—0,40

лимонной кислоты в отработавшем мицелии остается различное количество ее.

Мицелий ценен главным образом содержанием сырого протеина, в котором присутствуют в значительных количествах все незаменимые для животного организма аминокислоты. Перевариваемость белка примерно 50 %. Вместе с полноценным белком в нем содержатся углеводы, жир и его спутники, минеральные вещества, микроэлементы и витамины. Мицелий используется прежде всего как добавка к кормам животных [10]. Сырой (влажностью 75 %) мицелий быстро разлагается, поэтому не хранится и используется колхозами и совхозами главным образом в зимний и весенний периоды года. Сушка мицелия организована в крайне незначительном масштабе на Рижском заводе биохимических препаратов.

Скармливать сырым можно только мицелий поверхностной ферментации, так как в этом случае свободные цианиды остаются на дне кювет. При глубинной ферментации цианиды частично отфильтровываются вместе с мицелием и для их разложения требуется нагрев при сушке до температуры около 100 °С. При этом разлагаются и вещества, обладающие антибиотическим действием.

Сухой мицелий должен иметь влажность не более 10 % и гранулы размером 3—5 мм, показывать отсутствие свободных цианидов, быть безвредным для организма (тест-доза). С целью экономии тепла из мицелия предварительно удаляют 15—20 % влаги на вальцевом или шнековом прессе. Высушивать его можно в сушилках различных конструкций: с псевдокипящим слоем, на ленточных сушилках для травы АВМ-0,65, для мицелия ПВ1-О1ЛС2-16ВК-01 и др. В некоторых случаях глубинный мицелий приходится предварительно смешивать с небольшим количеством (до 20 %) уже высушенного. Теплоносителем является смесь газов сгорания дизельного топлива и воздуха температурой 500—700 °С, но продукт не должен нагреваться выше 100 °С.

Мицелием можно возместить в рационах животных и птицы до 30 % протеина. Добавление его к кормам повышает аппетит у животных, увеличивает привесы молодняка крупного рогатого скота на 25—28 %, свиней на 8—9 %, цыплят в 2,1—2,3 раза при снижении примерно на 5 % расхода кормов. Мясо не отличается по химическому составу и жирности, повышается содержание жира в молоке. У кур-несушек возрастает на 5 % яйценоскость, укрепляется скорлупа яиц. Кормовая ценность сухого мицелия около 1400 кормовых единиц в 1 т[1] (Д. Ф. Ермаков, Б. Д. Шаталин). С целью повышения содержания витамина B_{12} рекомендуется при ферментации добавлять в питательную среду соли кобальта.

Относительно высокое содержание, особенно в поверхностном мицелии, эргостерола, который после УФ-облучения превращается в витамин D_2, представляет интерес как для повышения его биологической ценности, так и для извлечения в виде самостоятельного продукта. Мицелий содержит приблизительно лишь в два раза меньше эргостерола, чем хлебопекарные дрожжи, и при бросовой цене может полностью заменить их.

Мицелий содержит биотин в связанном виде. Для использования в качестве источника ростовых веществ при производ-

---

[1] За 1 кормовую единицу (к. е.) в СССР с 1923 г. принимают питательную ценность 1 кг зерна овса среднего качества влажностью 13 % и натурной массой от 450 до 480 г/л, при скармливании которого у крупного рогатого скота откладывается 150 г жира или образуется 5,95 МДж тепла.

стве хлебопекарных дрожжей мицелий подвергают автолизу 10%-ной вытяжкой из суперфосфата при температуре 45—50 °С в течение 24 ч или кислотному гидролизу 15%-ной серной кислотой при избыточном давлении 0,15 МПа в течение 1 ч. Гидролизат можно частично нейтрализовать и профильтровать. Добавление 10 % автолизата (в пересчете на сухие вещества мицелия) к массе мелассы на стадии приготовления засевных дрожжей повышает их выход на неполноценных мелассах до 12 %.

Автолизатом мицелия можно заменить азот в средах для культивирования энтомофторовых грибов (паразитов многих видов вредных насекомых) в производстве биопрепаратов и в других производствах, основанных на жизнедеятельности микроорганизмов, в том числе и в самом производстве лимонной кислоты.

Использование мицелия как удобрения способствует росту растений. Сухой мицелий рекомендовано применять в производстве разнообразных высококачественных строительных и дорожных материалов. При производстве кирпича и керамзита он заменяет дорогостоящие выгорающие добавки органических веществ, увеличивает прочность кирпича на 7—10 % и снижает его объемную массу.

Мицелий вместе с гипсовым шламом можно использовать для получения пористых строительных плит.

В связи с этим представляет интерес изучение возможности и целесообразности возвращения гипсового шлама на станцию отделения глубинного мицелия и очистки культуральной жидкости от взвешенных примесей перед осаждением оксалата или цитрата кальция.

Обращается внимание на большую прочность содержащегося в мицелии хитина.

Цитратный фильтрат

В расчете на 1 т лимонной кислоты сухие вещества цитратного фильтрата составляют 0,8—1,2 т, натурального фильтрата 6—11%-ной концентрации получается 9—12 м³. В него переходят все неассимилируемые грибом составные части мелассы, продукты его метаболизма, за исключением основной массы лимонной и щавелевой кислот, которые осаждаются известью в процессе нейтрализации культуральной жидкости, и растворимые примеси известкового молока.

На отечественных и зарубежных заводах лимонной кислоты фильтрат выпаривают до 55—70%-ного содержания сухих веществ. Концентрированный фильтрат представляет собой темную густую жидкость кисло-соленого вкуса с горьковатым привкусом и запахом жженого сахара.

Плотность фильтрата в зависимости от содержания сухих веществ определяется уравнением [4]:

$$\rho = (1{,}01 + 0{,}53x)\,10^3 - 0{,}51t,$$

где ρ — плотность фильтрата, кг/м³; x — содержание сухих веществ, мас. доля; t — температура, °С.

Поверхностное натяжение [2]:

$$\sigma = \sigma_{вt} - 35x^{0,56}(1 - 10^{-2}x^2t),$$

где σ — поверхностное натяжение фильтрата при 0° С, Н/м; $\sigma_{вt}$ — поверхностное натяжение воды, Н/м; остальные обозначения те же, что и выше.

Зависимость вязкости фильтрата от температуры при различных концентрациях сухих веществ выражается уравнением [1]:

$$\mu = A \exp\left(-B\frac{t}{t+100}\right),$$

где μ — коэффициент динамической вязкости, Па·с; A и B — коэффициенты, зависящие от концентрации сухих веществ в фильтрате.

Величина коэффициентов A и B находится по уравнениям:

$$A = 1,8\cdot 10^{-3} \exp\left[3,5\left(\frac{x}{1-x}\right)^{1,035}\right];$$

$$B = 3,15 + 0,25 \exp 5,5x;$$

в этих уравнениях обозначения t и x — прежние.

Средний химический состав сухих веществ приведен ниже [74].

Химический состав сухих веществ концентрированного фильтрата (% мас.)

Органические вещества	75—80
В том числе	
Сырой протеин	23—25
Белок	1,4—1,9
Свободные аминокислоты	3—6
Бетаин	7—14
Безазотистые вещества	48—50
Редуцирующие вещества	5—10
Инвертный сахар	3—6
Лимонная кислота	2,5—5,0
Летучие кислоты	1,2—1,4
Минеральные вещества (зола)	25—30

При выпаривании под разрежением он мало изменяется, при давлении выше атмосферного содержание аминокислот уменьшается на 40 %, вероятно, вследствие реакций меланоидинообразования.

Аминокислоты представлены глютаминовой, аспарагиновой, γ-аминомасляной кислотами, треонином, серином, пролином, глицином, α-аланином, валином, триптофаном, лейцином, изолейцином, орнитином, метионином, тирозином, фенилаланином, лизином, гистидином и аргинином. Бетаин не ассимилируется A. niger, не осаждается известью при нейтрализации и практически полностью переходит в фильтрат; при его концентрировании не разрушается.

Редуцирующие вещества состоят в основном из инвертного сахара. Кроме него содержатся раффиноза, кестоза, пентозы. Некоторой восстанавливающей способностью обладают и красящие вещества.

Кроме лимонной кислоты найдены (в %): уксусная — 0,009; пропионовая, масляная, валериановая — следы; янтарная, фумаровая, яблочная, адипиновая, винная, глюконовая, молочная — по 0,29; щавелевая и малоновая — по 0,10; миристиновая, пимелиновая, стеариновая, субериновая, капроновая, лауриновая — по 0,01—0,02; олеиновая и линолевая — в количествах, меньших 0,01. При выпаривании содержание летучих кислот снижается вдвое.

Из витаминов установлено присутствие (в мкг/г); 0,32 тиамина, 9,0 рибофлавина, 0,1—0,3 биотина. Присутствие других витаминов не исследовалось.

Состав золы (в % к сухим веществам): K_2O 7,7—9,2, Na_2O 2,9—3,4, CaO 0,6—2, Fe_2O_3 1,5—3,8, SiO_2 0,7—1,3, SO_4 1,5—4,2, Cl_2 0,03—0,36, P_2O_5 0,014—0,030. Найдены микроэлементы: Mg, Al, Cu, Zn, Ni, Ba. Свободные цианиды отсутствуют, связанных — 15—30 мг/л. Раствор упаренного фильтрата имеет слабокислую реакцию (pH 5,5±0,5).

Фильтрат после сгущения, как и отработавший мицелий, используют в качестве добавки к кормам для животных при восполнении дефицита протеина до 25 %. В нем содержатся все незаменимые аминокислоты. Единственным недостатком упаренного фильтрата является содержание 4,5—6 % калия, соли которого действуют послабляюще на пищеварительный тракт, вследствие чего применение фильтрата ограничивается. Кроме того, при увеличении дозы фильтрата у животных наблюдается снижение суточных привесов, снижение перевариваемости азота и жира и проявление других нежелательных явлений. Упаренный фильтрат нельзя скармливать свиньям и птице из-за малого содержания белкового азота и наличия солей калия.

Концентрированный фильтрат скармливают молодняку крупного рогатого скота в возрасте не моложе 9—10 месяцев и взрослым животным, в частности, коровам. 1 т сухих веществ упаренного фильтрата эквивалентна 650—750 корм. ед. (1 т сухих веществ мелассы — 940). Наибольший эффект получен при откорме скота на сухом свекловичном жоме с поливом фильтратом, меньший на кислом жоме и наименьший — на силосе. Выпаренный фильтрат можно смешивать с частично подсушенным мицелием A. niger и получать сухую комбинированную кормовую добавку или смешивать их непосредственно перед скармливанием животным. Суточная норма скармливания фильтрата 0,6—1,3 кг на голову.

Институт им. А. Кирхенштейна АН ЛатвССР предложил состав премикса для откармливания свиней с использованием цитратного фильтрата. Упаренный фильтрат, обладающий кормовой ценностью, служит также эмульгатором и стабилизатором эмульсий масляных препаратов жирорастворимых витаминов A, D и E. В количестве около 10 % его смешивают с отрубями, мукой и другими сыпучими кормами, получая сухой премикс. Кроме того, в премикс добавляют концентрат лизина, соли микроэлементов, антибиотики, антиоксиданты (дилудан) и ферменты (амилосуб-

тилин). Добавление 5 % премиксов к моно- и полизерновым рационам приводит к увеличению среднесуточных привесов животных на 22 % при сохранении качества мяса [8].

На натуральном цитратном фильтрате можно выращивать кормовые дрожжи, производство которых много лет существует в ЧССР и других странах. Культивируют Candida tropicalis, C. scottii, C. utilis, C. aguatica, C. bimindalis, C. vartiovaarai и др. Наиболее продуктивные штаммы синтезируют 4—4,5 г биомассы (сухой), обычно 2—2,5 г на 1 л фильтрата.

Дрожжи выращивают при температуре 32—35 °С при аэрации среды в течение 8—9 ч при pH 4,5, поддерживая его в течение всего процесса с помощью серной кислоты. Культуральную жидкость после отделения дрожжей упаривают и используют как кормовую добавку.

Выращивание дрожжей на цитратном фильтрате снижает содержание сухих веществ в нем лишь на 4—5 % отн., в основном сахара. Несмотря на то, что при этом получается богатый белком кормовой продукт, полнее используется мелассное сырье, проблема полного использования фильтрата этим не решается, и он попрежнему остается наиболее обременительным отходом производства.

Цитратный фильтрат в натуральном виде можно использовать для производства кормового витамина B_{12}, культивируя на нем метанобразующие бактерии в анаэробных условиях при температуре 55—57 °С, в зависимости от содержания сухих веществ в фильтрате в течение 5—11 суток. Содержание сухих веществ в фильтрате снижается на 60 %, а БПК — на 80—85 %. Синтез витамина B_{12} усиливается при внесении в среду небольшого количества $Co(NO_3)_2$. Культуральную жидкость вместе с бактериями подкисляют соляной кислотой до pH 6,5 и выпаривают под разрежением до 60%-ного содержания сухих веществ, смешивают с отрубями и высушивают до влажности 8—10 %. В 1 кг препарата содержится 40—60 мг витамина B_{12} и до 20 % белков [31].

Предложено извлекать из фильтрата с помощью ионообменной смолы (смесь КУ-1 и К-2) бетаин в виде бетаинхлорида-ацидина. Однако потребность в ацидине невелика и уже покрывается из других источников. Более целесообразно было бы, вероятно, превращать сырую соль ацидина в триметиламин, служащий сырьем для производства кормового витамина — холинхлорида. Ежегодная потребность в нем животноводства исчисляется десятками тысяч тонн.

Выпаренный фильтрат можно использовать как добавку к бедным питательным средам при культивировании других микроорганизмов, при выработке органоминеральных удобрений под сахарную свеклу, после обогащения азотом (водным раствором аммиака) как удобрение и под другие культуры (при pH 6 и выше фильтрат хорошо перегнивает).

Выпаренный цитратный фильтрат используют в кожевенном производстве в качестве восстановителя солей шестивалентного хрома при получении жидких хромовых экстрактов. Расход фильтрата для полного восстановления хрома составляет 50—60 % к массе бихромата (2 т фильтрата заменяют 1 т мелассы). Он служит также в качестве одного из компонентов наполняющей смеси для жестких кож [32].

Имеются рекомендации на использование его в качестве связующего в формовочной земле в производствах металлического литья и в других.

Гипсовый шлам и другие отходы

На 1 т винной кислоты образуется гипсового шлама около 1,3 т (в расчете на $CaSO_4 \cdot 2H_2O$), а при 50%-ной влажности вдвое больше. Средняя плотность влажного шлама 1330 кг/м³, плотность сухого колеблется в пределах 2030—2120 кг/м³. Шлам на безводное вещество содержит 85—95 % гипса, 3—9 % оксалата кальция (без его предварительного выделения) и 0,2—0,7 % берлинской лазури [72].

Гипсовый шлам пока не используется. Добавление его к корму дало отрицательные результаты. Он может представлять интерес в качестве мелиоранта солончаковых почв или для известкования кислых почв, для использования в производстве строительных материалов.

В отдельных случаях использование гипсового шлама затрудняется вследствие примеси отработавшего активного угля, оксалата кальция, берлинской лазури и из-за высокой влажности.

Фильтрат производства винной кислоты и меловые осадки производства молочной кислоты не представляют большого хозяйственного интереса.

Берлинскую лазурь, содержащуюся в гипсовом шламе, с помощью известкового молока можно перевести в растворимый гексацианоферроат кальция и использовать в производстве всех трех кислот для осаждения железа. Реакция берлинской лазури с гидроксидом кальция протекает по уравнению

$$Fe_4[Fe(CN_6)]_3 + 6Ca(OH)_2 \rightarrow 4Fe(OH)_3 + 3Ca_2Fe(CN)_6.$$

Образующийся гидроксид железа удаляется вместе с осадком.

СТОЧНЫЕ ВОДЫ

На заводах лимонной кислоты на 1 т кристаллического продукта потребляется довольно много воды, что объясняется отсутствием типовой схемы водоснабжения и достаточно обоснованных норм по отдельным операциям. Удельный вес оборотного водоснабжения не превышает 7 %. Расходуется много воды питьевого достоинства, хотя в этом не всегда есть необходимость.

Сбрасывается сточных вод от 170 до 620 м³ (на 1 т лимонной кислоты). На большинстве заводов нет очистных сооружений, поэтому стоки при возможности разбавляют водой для соблюдения санитарно-химических норм их спуска в водоемы, что увеличивает не только расход воды, но и объем стоков.

Сточные воды производства лимонной кислоты можно разделить на три категории: цитратный фильтрат, промывные воды и условно чистые воды.

Фильтрат содержит [14] (мг/л): прокаленного остатка 5600—45 020, азота аммонийного 58—200, азота нитритного 10—24, азота нитратного 86—252, взвешенных веществ (сухих) 2200—3840. Биологическое потребление кислорода за 5 суток $БПК_5$=26 000—32 000 мг O_2/л, полное потребление (за 20 суток) $БПК_п$=34 600—64 200, химическое потребление кислорода ХПК=96 000÷137 000 мг

O_2/л. Среднее отношение (БПК$_п$: ХПК) 100 составляет около 46 % (при 50 % и более основная масса органических соединений сравнительно хорошо окисляется биохимически).

Наиболее дешевым способом утилизации фильтрата является его выпаривание и использование концентрата в народном хозяйстве. Выпаривание фильтрата требует примерно в пять раз меньше затрат, чем биологическая очистка.

Сточные воды второй категории (промывные воды) образуются в результате мойки различного оборудования и помещений. Количество их сравнительно невелико: 30—50 м^3/т лимонной кислоты. Они содержат до 8,5 г/л взвешенных веществ, имеют БПК$_п$=7988 мг O_2/л, ХПК=16 483 мг O_2/л. Санитарно-химические показатели промывной воды после мойки ферментационной камеры приведены в табл. 42 [14]. Отстаивание снижает ХПК в 1,8 раза. При мытье каждой камеры сбрасывается в канализацию 15—20 кг берлинской лазури.

Таблица 42

Санитарно-химическая характеристика сточной воды после мытья ферментационной камеры

Показатели	Пределы колебаний	Среднее
Цвет	Грязно-зеленоватый	—
pH среды	3,2—3,6	3,4
Кислотность, мг·экв/л	79,0—89,6	85,7
ХПК, мг O_2/л	12000—18000	16483,0
БПК$_п$, мг O_2/л	6420—8400	7988,0
(БПК$_п$:ХПК)·100, %	46—54	50,0
Взвешенные вещества, мг/л		
сухой остаток	7,96—8,35	8,06
прокаленный остаток	5,1—5,38	5,32
Взвешенные и растворенные сухие вещества, мг/л	10,5—12,9	12,81
Азот, мг/л		
аммонийный	14,0—19,0	18,0
нитритный	0,01—0,035	0,03
нитратный	8,5—11,3	10,0
Хлориды, мг/л	153,8—179,6	176,4
Сульфаты, мг/л	698,4—790,0	760,0
Фосфаты, мг/л	0,01—0,03	0,02

Сточные воды третьей категории слабо загрязнены (условно чистые). Они получаются в барометрических конденсаторах, мокровоздушных вакуум-насосах, воздухонагнетателях, теплообменных аппаратах и др., количество их сильно колеблется и составляет от 180 до 550 м^3 на 1 т лимонной кислоты, БПК$_п$=120÷150 мг O_2/л, ХПК=340÷360 мг O_2/л.

Промывные и условно чистые воды производства лимонной кислоты, соединенные вместе, имеют в среднем БПК$_п$=2400 мг O_2/л, ХПК=2400 мг O_2/л.

Известные способы очистки сточных вод всех категорий в производстве пищевых кислот еще недостаточно апробированы. Биологические способы в различных вариантах являются наиболее эффективными, но требуют больших капиталовложений и дорогой эксплуатации установки, особенно при сливании в сточные воды цитратного фильтрата. Там, где есть возможность, выгоднее всего очищать их совместно с городскими сточными водами, вводя заводские сточные воды в анаэробную камеру городской очистительной станции.

Потребность в кислороде на окисление самих пищевых кислот и максимально допустимая концентрация их в сточной воде приведены в табл. 43 [60].

Таблица 43

Биологическое и химическое потребление кислорода кислотами и допустимая концентрация их в сточных водах

Кислота	Потребность в кислороде, мг O_2/мг вещества				Максимальная концентрация, мг/л	
	ХПК	$БПК_5$	$БПК_п$	$БПК_п$/ХПК, %	МКб[1]	МКб.о.с.[2]
Лимонная	0,74	0,35	—	47,3	—	2500
Молочная	1,07	0,96	—	90,0	10	—
Винная	0,52	0,30	—	57,7	—	—

[1] МКб — максимальная концентрация вещества, которая при постоянном воздействии не вызывает нарушения биохимических процессов.

[2] МКб.о.с. — максимальная концентрация вещества, не влияющая на работу очистных сооружений при обеспечении оптимального режима биологического окисления (для аэротенка).

Глава 12. ПРИМЕНЕНИЕ ПИЩЕВЫХ КИСЛОТ

ЗНАЧЕНИЕ ОКСИКИСЛОТ В ПИТАНИИ

Роль лимонной, молочной, винной, яблочной и других оксикислот в питании человека недостаточно ясна, хотя и признана их полезность для организма. Введение этих кислот с фруктами, кисломолочными продуктами, безалкогольными напитками и др. стимулирует секреторные функции поджелудочной железы, усиливая выделение желудочного сока, повышая аппетит и способствуя лучшему усвоению пищи. Кислоты после всасывания из кишечника полностью сгорают. Так как D(—)-молочная кислота не усваивается, то за рубежом в продукты детского питания некоторые фирмы вводят только L(+)-молочную кислоту.

Толерантность человеческого организма к радикалам различных оксикислот полностью не исследована, но известно, что лимонная кислота окисляется быстрее винной. Лимонная и винная кислоты имеют низкую токсичность. Комитет экспертов ФАО ВОЗ установил для человека приемлемую суточную дозу лимонной кислоты 66—120 мг/кг массы.

Особое место в обмене веществ животного организма играют лимонная и молочная кислоты. Лимонная кислота является обязательным промежуточным продуктом в ЦТК, в котором перекрещиваются пути обмена углеводов, белков и жиров и образуется необходимая организму энергия. Любой дыхательный субстрат в конечном итоге превращается в диоксид углерода и воду. Лимонная кислота найдена в тканях мышц, крови, моче, в костях, зубах, волосах, молоке и др. Она широко распространена в растительном мире (плоды, ягоды, овощи, картофель и др.).

Молочная кислота вездесуща, она присутствует везде, где есть жизнь и, возможно, появилась на земле раньше, чем кислород в атмосфере. В организме животного и человека она образуется из глюкозы или гликогена в результате гликолиза (гликогенолиза). При достаточном снабжении организма кислородом образования молочной кислоты не происходит. Молочная кислота накапливается в мышцах при интенсивной работе и понижении их энергетических запасов. Она подвергается дальнейшему окислению, выделяясь с мочой и по́том, или используется печенью для ресинтеза гликогена.

Человек постоянно вводит в свой организм молочную кислоту со сметаной, творогом, простоквашей, кефиром, ацидофилином, айраном, кумысом, сыром, ржаным хлебом, квасом, квашеной капустой, солеными огурцами и многими другими продуктами. Следовательно, она не чужда нашему организму. Традиционное употребление кисломолочных продуктов объясняется влиянием молочнокислых бактерий — антагонистов гнилостной микрофлоры кишечника — уменьшением образования токсичных для организма продуктов разложения органических веществ и улучшением усвояемости животного белка.

Лимонная, винная и молочная кислоты используются в разнообразных продуктах питания, в различных отраслях промышленности, в сельском хозяйстве и медицине. Чтобы составить некоторое представление о чрезвычайном разнообразии и роли этих кислот в народном хозяйстве, целесообразнее исходить из проявления ими следующих свойств: 1) подкисления и регулирования pH; 2) бактериостатичности действия; 3) образования комплексов с металлами; 4) пластифицирования белков и эмульгирования.

ПОДКИСЛЕНИЕ И РЕГУЛИРОВАНИЕ pH

Лимонная, винная и молочная кислоты по сравнению с неорганическими — слабые кислоты. Они обладают более кислым вкусом, чем можно было бы ожидать, исходя только из констант их электролитической диссоциации. Кислый вкус зависит от общей (титруемой) кислотности, а не от величины pH, поэтому при одном и том же pH он будет тем сильнее, чем менее диссоциирована кислота. Порог ощущения при данном pH все же увеличивается с уменьшением константы электролитической диссоциации этих кислот и составляет (в мг/л): для молочной кис-

лоты 38—40, для лимонной и винной 23—27. Последние две кислоты мало различаются по степени диссоциации, поэтому и порог ощущения у них практически одинаков. Порог ощущения установлен для чистых растворов, в присутствии других вкусовых веществ он изменяется. Неясен вопрос о взаимосвязи аромата и кислого вкуса.

Лимонную кислоту определяют как резко выраженный подкислитель, вызывающий мгновенное кислое ощущение, но быстро пропадающее. Сейчас это самая важная фруктовая кислота, которая содержится в цитрусовых, черной смородине, малине, клубнике и других плодах. Молочная кислота — умеренный подкислитель, вызывающий слабое ощущение, которое держится долго. Винная кислота такая же резкая, как и лимонная.

Эти кислоты как подкислители взаимозаменяемы, но каждая из них предпочитается в определенных пищевых продуктах, не представляя конкуренции другим. Например, в кондитерских, ликеро-водочных изделиях и безалкогольных напитках в основном используют лимонную кислоту, в продуктах детского питания — молочную. Еще столетие назад важнейшей кислотой была винная, но в настоящее время она вытеснена лимонной. Молочная кислота за рубежом завоевала признание, как пищевая, сравнительно недавно — около 35 лет тому назад; до этого она находила лишь техническое применение (в кожевенной промышленности).

Молочная кислота во многих продуктах должна заменить уксусную с сохранением ее лишь в некоторых традиционных продуктах со специфическим вкусом. Уксусная кислота задерживает в организме окисление конечных продуктов, вызывает денатурацию белка, впитываясь в кровеносную систему, вызывает гемолиз, эмболию и симптомы ацидоза, в больших количествах — катар кишок, тошноту, понос, анемию, воспаление почек, тогда как молочная кислота не имеет противопоказаний и разрешена в диете при различных заболеваниях почек, желчного пузыря и поджелудочной железы.

Со временем среди подкислителей может появиться изолимонная кислота (при ферментации н-парафинов), синтетическая яблочная кислота (микробный синтез ее большого развития в мире не получил), синтетическая D,L-винная кислота. Другие органические кислоты — слабая янтарная, сильно токсичная щавелевая и другие не могут иметь будущего.

В кондитерской промышленности для подкисления карамели, конфет, пастилы, вафель, драже и других изделий применяют главным образом лимонную кислоту. Она усиливает и хорошо подчеркивает фруктовый вкус. Применение молочной кислоты при выработке карамели затрудняется содержанием в ней большого количества воды (увеличивается влажность карамельной массы, она растекается во время разделки) и разложением при температуре около 120 °C с выделением вредных паров.

При выработке желейных изделий (яблочного мармелада) применяют лактат, тартрат или цитрат натрия. Их добавляют

в яблочное пюре до введения сахара для того, чтобы замедлить образование студня, которое быстро происходит при взаимодействии пектина с сахаром. В присутствии этих солей молекулы пектина в яблочно-сахарной смеси становятся агрегативно устойчивыми, раздвигая время «садки» (застудневания). При подкислении мармеладной массы обычно другой оксикислотой, чем ее соль, модифицирующее действие солей в значительной мере снимается и заменяется буферным, снижающим скорость гидролитических реакций (инверсии сахарозы, гидролиза пектиновых веществ), нежелательных для мармелада. При этом инверсионная способность кислоты снижается примерно на 95 %, а кислый вкус — лишь на 15 %.

Лимонную кислоту добавляют в искусственный мед.

Пищевыми кислотами подкисляют и другие продукты. В растительные продукты, содержащие в естественном состоянии мало кислоты (например, в Средней Азии), добавляют лимонную кислоту: она повышает кислотность соков, компотов и варений. Молочную кислоту применяют для приготовления джемов, в которых она способствует обеспечению хорошей консистенции. Нежный вкус молочной кислоты превосходно сочетается с вкусом и ароматом большинства фруктов. В плодово-ягодных соках и сиропах лимонная и винная кислоты создают остроту и свежесть вкуса, способствуют защите пигментов от разложения (особенно клубничного сока). Молочная кислота не маскирует естественных вкуса и аромата фруктов. В безалкогольных напитках лучше органолептически воспринимается смесь лимонной и молочной кислот.

Подкисление важно в виноделии при переработке очень зрелого винограда и других плодов, когда содержание натуральных кислот в них недостаточно и вино получается слабое и темное. Для подкисления «плоских» вин, а также вин с повышенным содержанием солей используют лимонную кислоту; винная кислота не годится, так как образует осадки винного камня. Лучше применять молочную кислоту, она в небольшом количестве всегда содержится в вине и образуется при сбраживании яблочной кислоты. Молочной кислотой улучшают вкус сидра.

Молочную кислоту добавляют в затор или сырцовый солод в пивоварении, для снижения жесткости воды и pH до величины, близкой к оптимальной для действия амилолитических и протеолитических ферментов. При этом увеличивается выход экстрактивных веществ из солода, улучшается физиологическое состояние дрожжей, устраняется опасность инфицирования и повышается качество готового пива. Молочную кислоту применяют в производстве хлебопекарных дрожжей для очистки засевных дрожжей от посторонней микрофлоры, в том числе и от лактобацилл, а также для очистки мелассы, стимулируя размножение дрожжей. Подкисление мелассной среды в спиртовом производстве, с дальнейшим использованием спиртовых дрожжей в качестве хлебопекарных приводит к повышению активности, выхода дрожжей и улучшению качества выпеченного на них хлеба.

Лимонную кислоту с целью подкисления добавляют в мороженое, различные пищевые концентраты, некоторые маргарины, пищевые эссенции с ароматом цитрусовых, краситель из бузины, в соусы для малосоленой сельди специального посола. Молочная кислота как регулятор pH, улучшитель вкуса и текстуры применяется в производстве многих сыров, в производстве яичного белка — для более легкого отделения частиц скорлупы и лучшего взбивания, при квашении белокочанной капусты — для длительного сохранения, улучшения цвета и вкуса, в сухом концентрате кваса — для повышения кислотности.

БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ

Молочной кислоте часто приписывают свойство консерванта, но она не обладает каким-либо специфическим бактериостатическим действием, кроме действия, обусловленного кислотностью, и в этом отношении уступает уксусной кислоте. Бактериостатическое действие слабых кислот при одном и том же pH больше, чем у сильных [87]. Подкисление предотвращает рост микроорганизмов, и, так как жизнь их не продолжительна, то при прекращении размножения они погибают.

Молочная кислота сдерживает развитие только гнилостных бактерий (0,2%-ная кислота полностью подавляет бактерии группы мезентерикус, 0,3%-ная — бактерии коли), не действует на микроскопические грибы, на дрожжи или даже стимулирует их развитие, на чем основано применение ее в производствах, основанных на дрожжевом брожении. Тепловую стерилизацию в присутствии молочной кислоты можно вести при более низкой температуре.

Умеренно кислый вкус молочной кислоты при относительно высокой кислотности делает ее употребление, наряду с уксусом, предпочтительным в производстве таких продуктов, как консервированная рыба в кислом соке, маринованные столовая свекла, цветная капуста, огурцы, оливы, лук, в производстве майонеза и майонезных приправ. Молочную кислоту добавляют в тесто главным образом в летний период для предотвращения развития в хлебе картофельной палочки (очень чувствительной к кислотности).

Эту кислоту издавна используют в ветеринарии для подавления вредных кишечных микробов у поросят, только что отнятых от материнского молока, при воспалении желудка и кишечника, при гинекологических заболеваниях, язвенных поражениях кожи.

ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Способность оксикислот образовывать комплексные соединения используется в ряде отраслей промышленности. Известно, что на воздухе многие жиры и жирсодержащие продукты окисляются (прогоркают), приобретая неприятный привкус и запах. Окисление катализируют тяжелые металлы (Fe, Cu, Ni),

присутствующие в виде незначительной примеси. Прогорканию препятствуют антиокислители, например аскорбиновая кислота.

Лимонная (винная) кислота, связывая тяжелые металлы, является синергистом аскорбиновой кислоты или проявляет самостоятельно антиокислительное действие. Эффект обусловлен анионом цитрата, поэтому лимонная кислота может быть заменена ее натровой солью, моностеариловым эфиром и другими соединениями. Кроме того, лимонная кислота защищает аскорбиновую кислоту от разрушающего действия тяжелых металлов.

Сохранение естественной окраски многих природных продуктов и окраски, характерной для некоторых пищевых продуктов, зависит не только от величины pH, но и от устранения каталитического окисления красящих веществ тяжелыми металлами, что достигается с помощью оксикислот.

На образовании комплексов лимонной кислоты с соединениями железа основана промывка ее раствором пароводяного тракта энергоблоков на электростанциях при работе с паром высокого давления, имеющих элементы, изготовленные из аустенитной стали. 2—3%-ный раствор лимонной кислоты, ингибированный моноцитратом аммония, катапином и другими эффективными ингибиторами, при температуре около 100 °С переводит все окислы железа в раствор и при определенной скорости потока предотвращает опасность образования в промываемом контуре местных завалов из окалины и ржавчины. То же свойство ее используется в товарах бытовой химии — безабразивных порошкообразных средствах для чистки металлических поверхностей и мытья посуды.

За рубежом цитрат натрия применяют в моющих средствах вместо полифосфатов натрия. Полифосфаты при биологической очистке сточных вод не перерабатываются, загрязняют водоемы и ускоряют рост сорняков и водорослей. Цитрат натрия обеспечивает щелочность и буферность моющих средств, смягчает воду и полностью очищается на биофильтрах. Эффективность его действия принимают за 75 % эффективности полифосфатов. Пиролизом цитрата натрия получен щелочной детергент, разлагающийся биологически. В Бельгии создана фирма «Цитрекс», целью которой является разработка, освоение производства и продажа производных лимонной кислоты для использования в составе моющих средств.

ПЛАСТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ И ЭМУЛЬГИРОВАНИЕ

Хорошо известно, что при забое животных мясо получается вкуснее, если они находятся в спокойном и неизнуренном состоянии. Это объясняется тем, что в мышцах животных содержится больше гликогена, который после смерти диссимилирует в молочную кислоту, пластифицируя белок.

Известно также, что при изготовлении хлеба молочную кислоту добавляют или получают при брожении теста, воздействуя на клейковину. Таким образом молочная кислота и ее соли в при-

сутствии воды являются сильными пластификаторами почти всех белков. В хлебопечении молочная кислота и лактаты увеличивают объем мякиша и улучшают корочку хлеба при использовании муки низкого качества. Благодаря солоноватому привкусу добавление лактата натрия в хлебобулочные и кондитерские изделия придает им пикантный вкус.

Лимонную кислоту добавляют в блинную муку.

Пластифицирующие свойства лактатов, их способность удерживать влагу используют в производстве продуктов детского питания, колбас, сыров, в засолочных жидкостях; свойства цитратов используют в пластификаторах для мыла.

Другим важным свойством натриевых солей оксикислот является пенообразующая способность и улучшение механических свойств пены. Так, лактат натрия повышает объем и стабильность пены в белково-сбивных массах кондитерских изделий, мороженого, заменяя до 20 % яичного белка.

При введении в молекулу моно- и диглицеридов оксикислот получают тонкодиспергирующие эмульгаторы. Так как в моноглицеридах липофильная часть молекулы значительно больше гидрофильной, то для повышения гидрофильности их этерифицируют водорастворимыми кислотами — молочной, лимонной и диацетилвинной. Эмульгаторы расщепляются в пищеварительном тракте организма и используются на построение жира; они нетоксичны и разрешены в качестве добавок в продукты питания. Эфиры оксикислот с глицеридами являются и антиокислителями.

Диацетилвиннокислый эфир моноглицеридов — улучшитель хлеба [61]. Он увеличивает объем буханки на 15—30 % (что очень важно при механизированных процессах хлебопечения), пористость и сжимаемость мякиша. Тесто из муки как со слабой, так и с короткорвущейся клейковиной имеет более высокую вязкость, повышается водопоглотительная способность теста, хлеб дольше сохраняет свежесть.

Применение эфиров моноглицеридов оксикислот в кондитерской промышленности снижает вязкость шоколадной глазури, расход какао масла в шоколаде, сообщает шоколаду блеск, препятствуя кристаллизации сахара. В США пользуются стеариловым полилактатом кальция и стеарилполимолочной кислотой. Первый добавляют в дрожжевые хлебобулочные изделия, вторую — в изделия с химическими разрыхлителями.

Лимонную кислоту и диацетилвиннокислый эфир моноглицеридов добавляют в маргарин.

ДРУГИЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Оксикислоты и их соли находят широкое применение в медицине и химико-фармацевтической промышленности. Цитрат натрия добавляют в кровь человека и животных при переливаниях и заготовках больших количеств ее (блокирует ионы

кальция, предотвращая свертываемость крови и образование сгустков), для подщелачивания крови и мочи, в бо́льших дозах — в качестве послабляющего. Растворы цитрата натрия растворяют плохо растворимые соединения — салициловую, бензойную и галловую кислоты. Цитраты аммония, калия, висмута, серебра, железа, меди и других элементов применяют как внутренние и наружные лекарства.

Лимонная кислота при свинцовых отравлениях переводит свинец в трудно всасываемое соединение, используется для получения водорастворимых солей фармакологически важных оснований — цитраткофеина, цитраткофеинаммония, цитраткокаина и др. Она является хорошим растворителем глицерофосфатов кальция, стронция, магния и железа.

Лактат кальция — важный терапевтический препарат при лечении кальциевой недостаточности (рахит). Он легко ассимилируется организмом и не раздражает слизистую желудка. Применяется как кровеостанавливающее средство при легочных, желудочно-кишечных, носовых и других кровотечениях, в хирургической практике — для повышения свертываемости крови, при аллергических заболеваниях (бронхиальная астма, крапивница) — для снятия зуда, в качестве противоядия — при отравлении солями магния.

Лактат магния обладает послабляющим действием, лактат закисного железа применяют при остром и хроническом малокровии По сравнению с другими препаратами железа лактат лучше всасывается и хорошо переносится больными.

Винный камень используется как мочегонное и послабляющее средство.

Фирма Майлз (США) на базе безводной лимонной кислоты выпускает различные шипучие болеутоляющие таблетки и порошки, с гидрокарбонатом натрия — «алка-зельцер» (за один год их потребляют больше, чем живет людей на Земле). Эта же фирма выпускает препараты цитратов с витаминами против рахита и других заболеваний.

Цитрат меди применяют в офтальмологии как вяжущее и противовоспалительное средство.

Добавление 1 % лактата кальция в корм для кур повышает яйценоскость на 15 % (при несколько меньшем размере яиц) вследствие уменьшения в кишечнике птиц количества микробов, разрушающих белок.

Лимонная кислота является составной частью многих косметических препаратов — эликсиров, лосьонов, шампуней, фиксаторов волос и т.д. Растворы цитрата могут применяться для борьбы с загрязнениями воды (см. «Образование комплексных соединений») и воздуха. Во втором случае анионы цитрата поглощают сульфит серы, выделяемый в атмосферу рудоплавильными заводами и электростанциями, работающими на каменном угле; цитрат и сера регенерируются.

В кулинарии кальциевые соли оксикислот используют для укрепления прочности яблок перед варкой — лабильная пектиновая структура превращается в менее растворимую пектата кальция (другие соли — хлорид, карбонат кальция — имеют вкусовые ограничения). Кристаллические гидротартрат калия и гидрокарбонат натрия вступают в реакцию только при высокой температуре, выделяя диоксид углерода. Такие химические разрыхлители теста используют вместо дрожжей в производстве некоторых изделий из муки.

Оксикислоты играют определенную роль в химической промышленности, однако использование их сдерживается незначительной растворимостью в органических растворителях, бифункциональностью, а для молочной кислоты — еще самоконденсацией (образованием «ангидридов»). Некоторые эфиры лимонной кислоты получают и применяют как растворители и пластификаторы в лакокрасочной и пластмассовой промышленности, используют в катализаторе для окиси этилена и т. д.

Винная кислота не может быть заменена другой в электротехнической промышленности, где в ее солях, особенно сеньетовой, ценят пиро- и пьезоэлектрические свойства, способность образования электроакустического поля и фонного эха. В частности, на пьезоэлектриках производят громкоговорители и микрофоны, различные преобразователи частот, запоминающие устройства ЭВМ.

Оксикислоты находят и другое разнообразное применение. Например, в кожевенной промышленности молочная кислота — для декальцинации голья и пушнины, преимущество ее перед минеральными кислотами в том, что даже неопытный работник не может повредить кожу и мех; в текстильной промышленности молочная кислота и ее сурьмяная соль — в протравном крашении и отделке тканей — аппретуре (Na-лактат вместо глицерина). Лактаты применяют в качестве антикоррозионных агентов в растворах антифризов.

Лимонная кислота как подкислитель входит в составы, придающие тканям несминаемость и прочность.

Лимонную кислоту используют при электротравлении меди и медных сплавов, в растворах красителей в цветной фотографии, производстве кинопленки, фотопластинок и фотобумаги, в ионообменниках для разделения редких элементов — церия, иттрия, америция. В аналитической химии ценят комплексообразующие свойства винной кислоты.

В пищевой промышленности лимонную кислоту применяют для устранения мути в вине, вызванной образованием танин-железных и фосфат-железных соединений; для торможения образования меланоидинов в сгущенном молоке с сахаром, при рафинации растительных масел; раствором ее промывают и дезодорируют жировое сырье; обрабатывают перед холодным хранением свежую рыбу, мясо, дичь, ракообразных (креветки, крабы), фрукты и овощи с целью стабилизации их цвета, вкуса и запаха. Лимонная кислота облагораживает табак, связывая его летучие основы.

Молочную кислоту можно использовать для ускорения получения молочно-белкового сгустка при производстве творога, кислые соли типа $M\ (C_3H_5O_3)_x(C_3H_6O_3)_n$, где M — катион металла валентности x и $n = 1 \div 20$ (обычно 4—12) — для улучшения качества и сохранности пищевых продуктов.

Сказанным выше не ограничиваются возможные пути использования оксикислот в различных отраслях народного хозяйства. С углублением наших знаний о свойствах этих кислот и их производных следует ожидать новых достижений в данной области.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Таблица I

Растворимость лимонной кислоты в воде

Температура, °С	Растворено кислоты, % мас	Растворено кислоты, кг на 1 кг воды	Температура, °С	Растворено кислоты, % мас	Растворено кислоты, кг на 1 кг воды
0	48,94	0,96	51	71,96	2,57
1	49,47	0,98	52	72,21	2,60
2	49,99	1,00	53	72,46	2,63
3	50,23	1,01	54	72,72	2,67
4	51,06	1,04	55	72,97	2,70
5	51,59	1,07	56	73,23	2,74
6	52,12	1,09	57	73,48	2,77
7	52,65	1,11	58	73,74	2,81
8	53,18	1,14	59	74,00	2,85
9	53,71	1,16	60	74,25	2,88
10	54,24	1,19	61	74,51	2,92
11	54,77	1,21	62	74,77	2,96
12	55,30	1,24	63	75,03	3,00
13	55,83	1,26	64	75,29	3,05
14	56,36	1,29	65	75,55	3,09
15	56,89	1,32	66	75,81	3,13
16	57,42	1,35	67	76,08	3,18
17	57,95	1,38	68	76,34	3,23
18	58,48	1,41	69	76,60	3,27
19	59,01	1,44	70	76,87	3,32
20	59,55	1,47	71	77,13	3,37
21	60,08	1,51	72	77,40	3,42
22	60,61	1,54	73	77,66	3,48
23	61,14	1,57	74	77,93	3,53
24	61,67	1,61	75	78,20	3,59
25	62,20	1,65	76	78,46	3,64
26	62,73	1,68	77	78,73	3,70
27	63,26	1,72	78	79,00	3,76
28	63,79	1,76	79	79,27	3,82
29	64,32	1,80	80	79,54	3,89
30	64,85	1,84	81	79,81	3,95
31	65,38	1,89	82	80,08	4,02
32	65,91	1,93	83	80,35	4,09
33	66,44	1,98	84	80,63	4,16
34	66,97	2,03	85	80,89	4,23
35	67,50	2,08	86	81,17	4,31
36	68,03	2,13	87	81,45	4,39
37	68,48	2,17	88	81,72	4,47
38	68,72	2,20	89	82,00	4,56
39	68,97	2,22	90	82,27	4,64
40	69,21	2,25	91	82,55	4,73
41	69,46	2,27	92	82,83	4,82
42	69,71	2,30	93	83,11	4,92
43	69,95	2,33	94	83,39	5,02
44	70,20	2,36	95	83,67	5,12
45	70,45	2,38	96	83,94	5,25
46	70,70	2,41	97	84,23	5,34
47	70,95	2,44	98	84,45	5,43
48	71,20	2,47	99	84,79	5,57
49	71,45	2,50	100	85,07	5,70
50	71,70	2,53	—	—	—

Таблица II

Растворимость L-винной кислоты в воде

Температура, °С	Растворено кислоты		Температура, °С	Растворено кислоты	
	% мас.	кг на 1 кг воды		% мас.	кг на 1 кг воды
0	52,74	1,11	52	65,33	1,88
1	52,96	1,13	53	65,59	1,90
2	53,19	1,14	54	65,85	1,93
3	53,41	1,15	55	66,11	1,95
4	53,64	1,16	56	66,37	1,97
5	53,87	1,17	57	66,63	1,99
6	54,10	1,18	58	66,90	2,02
7	54,33	1,19	59	67,16	2,05
8	54,56	1,20	60	67,42	2,07
9	54,79	1,21	61	67,69	2,09
10	55,02	1,22	62	67,95	2,12
11	55,25	1,23	63	68,22	2,15
12	55,49	1,25	64	68,48	2,17
13	55,72	1,26	65	68,75	2,20
14	55,96	1,27	66	69,02	2,23
15	56,19	1,28	67	69,29	2,26
16	56,42	1,30	68	69,56	2,28
17	56,66	1,31	69	69,82	2,31
18	56,90	1,32	70	70,09	2,34
19	57,14	1,33	71	70,37	2,37
20	57,38	1,35	72	70,64	2,41
21	57,61	1,35	73	70,91	2,44
22	57,85	1,37	74	71,18	2,47
23	58,09	1,38	75	71,47	2,50
24	58,33	1,40	76	71,73	2,54
25	58,58	1,41	77	72,00	2,57
26	58,82	1,43	78	72,28	2,61
27	59,06	1,44	79	72,55	2,64
28	59,30	1,46	80	72,83	2,68
29	59,55	1,47	81	73,11	2,72
30	59,79	1,49	82	73,39	2,76
31	60,04	1,50	83	73,66	2,80
32	60,28	1,52	84	73,94	2,84
33	60,53	1,53	85	74,22	2,88
34	60,77	1,55	86	74,50	2,92
35	61,02	1,57	87	74,78	2,97
36	61,27	1,58	88	75,07	3,01
37	61,51	1,60	89	75,35	3,06
38	61,77	1,62	90	75,63	3,10
39	62,02	1,63	91	75,91	3,15
40	62,27	1,65	92	76,20	3,20
41	62,52	1,67	93	76,48	3,28
42	62,77	1,69	94	76,77	3,30
43	63,03	1,70	95	77,06	3,36
44	63,28	1,72	96	77,34	3,41
45	63,54	1,74	97	77,63	3,47
46	63,79	1,76	98	77,92	3,53
47	64,05	1,78	99	78,21	3,58
48	64,30	1,80	100	78,50	3,65
49	64,56	1,82	—	—	—
50	64,82	1,84	—	—	—
51	65,07	1,86			

Таблица III

Относительная плотность водных растворов молочной кислоты (d_4^{20})

Концентрация, % мас.	d	Концентрация, % мас.	d	Концентрация, % мас.	d
1	1,0003	35	1,0804	69	1,1603
2	1,0024	36	1,0829	70	1,1625
3	1,0046	37	1,0853	71	1,1648
4	1,0067	38	1,0878	72	1,1669
5	1,0088	39	1,0903	73	1,1691
6	1,0109	40	1,0927	74	1,1713
7	1,0130	41	1,0952	75	1,1735
8	1,0152	42	1,0976	76	1,1757
9	1,0173	43	1,1001	77	1,1778
10	1,0194	44	1,1026	78	1,1800
11	1,0216	45	1,1050	79	1,1822
12	1,0240	46	1,1075	80	1,1843
13	1,0264	47	1,1099	81	1,1865
14	1,0289	48	1,1124	82	1,1885
15	1,0313	49	1,1149	83	1,1905
16	1,0337	50	1,1173	84	1,1925
17	1,0362	51	1,1157	85	1,1945
18	1,0386	52	1,1222	86	1,1965
19	1,0410	53	1,1244	87	1,1984
20	1,0435	54	1,1267	88	1,2004
21	1,0459	55	1,1290	89	1,2024
22	1,0484	56	1,1312	90	1,2044
23	1,0509	57	1,1335	91	1,2064
24	1,0534	58	1,1358	92	1,2084
25	1,0558	59	1,1380	93	1,2104
26	1,0583	60	1,1401	94	1,2124
27	1,0608	61	1,1423	95	1,2144
28	1,0633	62	1,1446	96	1,2164
29	1,0657	63	1,1468	97	1,2183
30	1,0682	64	1,1491	98	1,2203
31	1,0706	65	1,1513	99	1,2223
32	1,0731	66	1,1535	100	1,2243
33	1,0755	67	1,1558		
34	1,0780	68	1,1580		

Таблица IV

Относительная плотность водных растворов L-винной кислоты [54]

Концентрация, % мас.	Значения d_4^t при t, °С					
	10	20	30	40	50	60
5	1,0238	1,0211	1,0183	1,0146	1,0097	1,0060
10	1,0464	1,0445	1,0414	1,0374	1,0324	1,0281
16	1,0780	1,0742	1,0704	1,0652	1,0603	1,0555
20	1,0981	1,0944	1,0901	1,0853	1,0802	1,0749
24	1,1192	1,1152	1,1107	1,0560	1,1002	1,0947
30	1,1522	1,1475	1,1427	1,1372	1,1314	1,1257
36	1,1867	1,1817	1,1762	1,1701	1,1642	1,1580
40	1,2106	1,2051	1,1993	1,1932	1,1861	1,1795
44	1,2346	1,2292	1,2231	1,2169	1,2102	1,2036
50	1,2717	1,2660	1,2600	1,2536	1,2468	1,2400

Таблица V

Относительная плотность водных растворов лимонной кислоты (d_4^{15})

Концентрация		d	Концентрация		d	Концентрация		d
% мас	г/л		% мас	г/л		% мас	г/л	
1	10,039	1,0039	23	251,413	1,0931	45	537,660	1,1948
2	20,148	1,0074	24	263,328	1,0972	46	551,908	1,1998
3	30,333	1,0111	25	275,400	1,1016	47	566,400	1,2051
4	40,596	1,0149	26	287,560	1,1060	48	580,944	1,2103
5	50,940	1,0188	27	299,862	1,1106	49	595,497	1,2153
6	61,362	1,0227	28	312,256	1,1152	50	610,200	1,2204
7	71,876	1,0268	29	324,742	1,1198	51	625,056	1,2256
8	82,472	1,0309	30	336,720	1,1224	52	639,964	1,2307
9	93,150	1,0350	31	349,928	1,1288	53	654,974	1,2358
10	103,920	1,0392	32	362,656	1,1333	54	670,140	1,2410
11	114,741	1,0431	33	375,474	1,1378	55	685,410	1,2462
12	125,640	1,0470	34	388,348	1,1422	56	700,784	1,2514
13	136,617	1,0509	35	400,330	1,1438	57	716,776	1,2576
14	147,686	1,0549	36	414,540	1,1515	58	732,366	1,2627
15	158,865	1,0591	37	427,831	1,1563	59	748,297	1,2683
16	170,112	1,0632	38	441,256	1,1612	60	764,280	1,2738
17	181,475	1,0675	39	454,779	1,1661	61	780,434	1,2794
18	192,924	1,0718	40	468,360	1,1709	62	796,576	1,2848
19	204,459	1,0761	41	482,201	1,1761	63	812,952	1,2904
20	216,100	1,0805	42	496,188	1,1814	64	829,440	1,2960
21	227,787	1,0847	43	509,808	1,1856	65	845,975	1,3015
22	239,558	1,0889	44	523,556	1,1899	66	862,686	1,3071

Таблица VI

Температура кипения растворов лимонной кислоты при различном внешнем давлении

Концентрация лимонной кислоты, г/л	Давление, кПа								
	101,33	47,99	34,65	21,33	18,66	14,66	10,66	8,00	5,33
250	100,6	81,4	73,1	62,2	59,2	54,2	47,7	42,1	34,7
300	100,7	81,5	73,2	62,3	59,3	54,3	47,8	42,2	34,8
350	100,8	81,6	73,3	62,4	59,4	54,4	47,9	42,3	34,9
400	100,9	81,7	73,4	62,5	59,5	54,5	48,0	42,4	35,0
450	101,1	81,9	73,6	62,7	59,7	54,7	48,2	42,6	35,2
500	101,2	82,0	73,7	62,8	59,8	54,8	48,3	42,7	35,3
550	101,6	82,4	74,1	63,2	60,2	55,2	48,7	43,1	35,7
600	101,9	82,7	74,4	63,5	60,5	55,5	49,0	43,4	36,0
650	102,3	83,1	74,8	63,9	60,9	55,9	49,4	43,8	36,4
700	102,5	83,3	75,0	64,1	61,1	56,1	49,6	44,0	36,6
750	103,3	84,1	75,8	64,9	61,9	56,9	50,6	44,8	37,4
800	104,0	84,8	76,5	65,6	62,6	57,6	51,1	45,5	38,1
850	105,4	86,2	77,9	67,0	64,0	59,4	52,5	46,9	39,5
900	106,4	87,2	78,9	68,0	65,0	60,4	53,5	47,9	40,5
950	107,9	88,7	80,4	69,5	66,5	61,9	55,0	49,4	42,0
1000	108,8	89,6	81,3	70,4	67,4	62,8	55,9	50,3	42,9
1050	109,9	90,7	82,4	71,5	68,5	63,9	57,0	51,4	44,0
1100	110,7	91,6	83,2	72,3	69,3	64,7	57,8	52,2	44,8

Таблица VII

Физические константы эфиров молочной кислоты

Эфир	Химическая формула	Молекулярная масса	Относительная плотность d_4^{20}	Температура кипения, °C	Коэффициент рефракции n_D^{25}
Метиловый	$CH_3—CH(OH)—COO—CH_3$	104,10	1,0895	60/42,6*	1,413
Этиловый	$CH_3—CH(OH)—COO—C_2H_5$	118,13	1,0304	42/9,3	1,412
Пропиловый	$CH_3—CH(OH)—COO—C_3H_7$	132,16	0,9915	47/6,7	1,417
Бутиловый	$CH_3—CH(OH)—COO—C_4H_9$	146,19	0,9768	70/9,3	1,420
Изобутиловый	$CH_3—CH(OH)—COO—C_4H_9$	146,18	0,9692	63/10,4	1,418

* Знаменатель указывает давление (гПа), соответствующее температуре кипения

Таблица VIII

Физические константы эфиров L-винной и лимонной кислот

Эфир	Молекулярная масса	Относительная плотность	Температура		Коэффициент рефракции, n_D^{25}	Растворимость, г/100 г воды
			плавления	кипения		
L-винная кислота						
Диметиловый	178,15	1,340/15*	48 (α-форма)	158/15**	—	р.
Моноэтиловый	178,15	—	90	—	—	р.
Диэтиловый	206,20	1,204/20	17	137/6,7	1,4454	р.
Дибутиловый	262,30	1,087/20	22,5	203/24	1,4463	—
Дипропиловый	234,25	1,139/20	—	171/24	—	н. р.
Диацетат	290,27	1,109/70	67	292/965	—	т. р.
Лимонная кислота						
Триметиловый	234,21	—	79	287 разл.	—	т. р.
Триэтиловый	276,28	1,137/25	—	126/1,3	1,4455	6,5
Три-н-бутиловый	360,43	1,042/25	—	170/1,3	1,4431	0,002
Ацетилтриэтиловый	318,31	1,135/25	—	131/1,3	1,4386	0,72
Ацетилтри-н-бутиловый	402,46	1,046/25	—	173/1,3	1,4408	0,002

* Знаменатель указывает температуру, при которой определена плотность относительно плотности воды при 4° С

** Знаменатель указывает давление (гПа), соответствующее температуре кипения

Таблица IX

Содержание окиси кальция в зависимости от плотности известкового молока при 20° С

Плотность	Содержание CaO		$Ca(OH)_2$, г/100 г	Плотность	Содержание CaO		$Ca(OH)_2$, г/100 г
	г/100 г	г/л			г/100 г	г/л	
1,009	0,99	10	1,31	1,119	14,30	160	18,90
1,017	1,96	20	2,59	1,126	15,10	170	19,95
1,025	2,93	30	3,84	1,133	15,89	180	21,00
1,032	3,88	40	5,13	1,140	16,67	190	22,03
1,039	4,81	50	6,36	1,148	17,43	200	23,03
1,046	5,74	60	7,58	1,155	18,19	210	24,04
1,054	6,65	70	8,79	1,162	18,94	220	25,03
1,061	7,54	80	9,96	1,169	19,68	230	26,01
1,068	8,43	90	11,14	1,176	20,41	240	26,96
1,075	9,30	100	12,29	1,184	21,12	250	27,91
1,083	10,16	110	13,43	1,191	21,84	260	28,86
1,090	11,01	120	14,55	1,198	22,55	270	29,80
1,097	11,86	130	15,67	1,205	23,24	280	30,71
1,104	12,68	140	16,76	1,213	23,92	290	31,61
1,111	13,50	150	17,84	1,220	24,60	300	32,51

Таблица X

Содержание моногидрата в зависимости от плотности серной кислоты при 20° С

Плотность	Содержание H_2SO_4		Плотность	Содержание H_2SO_4		Плотность	Содержание H_2SO_4	
	г/100 г	г/л		г/100 г	г/л		г/100 г	г/л
1,005	1	10,05	1,170	24	280,0	1,366	47	642,0
1,012	2	20,24	1,178	25	294,6	1,376	48	660,5
1,018	3	30,55	1,186	26	308,4	1,385	49	678,8
1,025	4	41,00	1,194	27	322,4	1,395	50	697,6
1,032	5	51,58	1,202	28	336,6	1,405	51	716,5
1,038	6	62,31	1,210	29	351,6	1,415	52	735,7
1,045	7	73,17	1,219	30	365,6	1,425	53	755,1
1,052	8	84,18	1,227	31	380,3	1,435	54	774,9
1,059	9	95,32	1,235	32	395,2	1,445	55	794,9
1,066	10	106,6	1,243	33	410,3	1,456	56	815,2
1,073	11	118,0	1,252	34	425,5	1,466	57	835,7
1,080	12	129,6	1,260	35	441,1	1,477	58	856,5
1,087	13	141,4	1,268	36	456,6	1,488	59	877,6
1,095	14	153,3	1,277	37	472,5	1,498	60	898,8
1,102	15	165,3	1,286	38	488,5	1,509	61	920,6
1,109	16	177,5	1,294	39	504,7	1,520	62	942,4
1,117	17	189,9	1,303	40	521,1	1,531	63	964,5
1,124	18	202,4	1,312	41	537,7	1,542	64	986,9
1,132	19	215,0	1,321	42	554,6	1,553	65	1010
1,139	20	227,9	1,329	43	571,6	1,565	66	1033
1,147	21	240,9	1,338	44	588,9	1,576	67	1056
1,155	22	254,1	1,348	45	606,4	1,587	68	1079
1,163	23	267,4	1,357	46	624,2	1,599	69	1103

Плотность	Содержание H_2SO_4		Плотность	Содержание H_2SO_4		Плотность	Содержание H_2SO_4	
	г/100	г/л		г/100	г/л		г/100	г/л
1,611	70	1127	1,738	81	1408	1,824	92	1678
1,622	71	1152	1,749	82	1434	1,828	93	1700
1,634	72	1176	1,759	83	1460	1,8312	94	1721
1,646	73	1201	1,769	84	1486	1,8337	95	1742
1,657	74	1226	1,779	85	1512	1,8355	96	1762
1,669	75	1252	1,787	86	1537	1,8363	97	1781
1,681	76	1278	1,795	87	1562	1,8365	98	1799
1,693	77	1303	1,802	88	1586	1,8342	99	1816
1,704	78	1329	1,809	89	1610	1,8305	100	1831
1,716	79	1355	1,814	90	1633			
1,727	80	1382	1,819	91	1656			

Таблица XI

Коэффициент рефракции растворов лимонной кислоты различной концентрации (температура 20° С)

Содержание лимонной кислоты, г/100 мл	n_D	Содержание лимонной кислоты, г/100 мл	n_D	Содержание лимонной кислоты, г/100 мл	n_D
0,0	1,33299	33,0	1,3689	65,0	1,4009
1,0	1,3334	34,0	1,3697	66,0	1,4018
2,0	1,3354	35,0	1,3706	67,0	1,4028
3,0	1,3366	36,0	1,3715	68,0	1,4039
4,0	1,3378	37,0	1,3726	69,0	1,4048
5,0	1,3388	38,0	1,3736	70,0	1,4058
6,0	1,3400	39,0	1,3746	71,0	1,4068
7,0	1,3411	40,0	1,3755	72,0	1,4078
8,0	1,3421	41,0	1,3766	73,0	1,4088
9,0	1,3432	42,0	1,3776	74,0	1,4099
10,0	1,3442	43,0	1,3786	75,0	1,4109
11,0	1,3452	44,0	1,3795	76,0	1,4118
12,0	1,3462	45,0	1,3806	77,0	1,4138
13,0	1,3471	46,0	1,3816	78,0	1,4148
14,0	1,3481	47,0	1,3825	79,0	1,4157
15,0	1,3492	48,0	1,3835	80,0	1,4167
16,0	1,3502	49,0	1,3844	81,0	1,4167
17,0	1,3513	50,0	1,3855	82,0	1,4177
18,0	1,3524	51,0	1,3865	83,0	1,4187
19,0	1,3534	52,0	1,3875	84,0	1,4197
20,0	1,3546	53,0	1,3885	85,0	1,4206
21,0	1,3557	54,0	1,3897	86,0	1,4217
22,0	1,3568	55,0	1,3908	87,0	1,4227
23,0	1,3579	56,0	1,3918	88,0	1,4237
24,0	1,3590	57,0	1,3928	89,0	1,4246
25,0	1,3604	58,0	1,3938	90,0	1,4257
26,0	1,3616	59,0	1,3949	91,0	1,4267
27,0	1,3628	60,0	1,3958	92,0	1,4279
28,0	1,3640	61,0	1,3968	93,0	1,4288
29,0	1,3651	62,0	1,3978	94,0	1,4298
30,0	1,3661	63,0	1,3989	—	—
31,0	1,3671	64,0	1,3999		
32,0	1,3680				

Таблица XII

Коэффициент рефракции маточных растворов различной концентрации

Содержание лимонной кислоты, г/100 мл	n_D (первый маточный раствор)	n_D (второй маточный раствор)	n_D (третий маточный раствор)	Содержание лимонной кислоты, г/100 мл	n_D (первый маточный раствор)	n_D (второй маточный раствор)	n_D (третий маточный раствор)
5	1,3391	1,3394	1,3398	40	1,3773	1,3802	1,3838
7	1,3414	1,3418	1,3434	45	1,3828	1,3860	1,3901
10	1,3446	1,3454	1,3470	50	1,3883	1,3918	1,3961
15	1,3502	1,3511	1,3531	55	1,3938	1,3978	1,4022
20	1,3555	1,3571	1,3591	60	1,3995	1,4033	1,4083
25	1,3610	1,3629	1,3651	65	1,4050	1,4098	1,4144
30	1,3668	1,3686	1,3714	70	1,4105	1,4150	1,4206
35	1,3720	1,3744	1,3777	75	1,4162	1,4210	1,4268

Таблица XIII

Растворимость лактата кальция в воде

Температура, °С	Растворено, % мас.	Температура, °С	Растворено, % мас	Температура, °С	Растворено, % мас.
5	2,357	32	5,710	59	17,086
6	2,435	33	5,899	60	17,886
7	2,5165	34	6,095	61	18,735
8	2,600	35	6,30	62	19,636
9	2,6875	36	6,509	63	20,598
10	2,7765	37	6,724	64	21,618
11	2,8685	38	6,948	65	22,698
12	2,965	39	7,181	66	23,848
13	3,0635	40	8,385	67	25,073
14	3,165	41	8,635	68	26,378
15	3,2715	42	8,900	69	27,758
16	3,3800	43	9,183	70	29,228
17	3,492	44	9,483	71	30,793
18	3,608	45	9,801	72	32,448
19	3,7295	46	10,142	73	34,228
20	3,853	47	10,502	74	36,098
21	3,981	48	10,887	75	38,103
22	4,115	49	11,292	76	40,218
23	4,251	50	11,728	77	42,468
24	4,392	51	12,188	78	44,878
25	4,539	52	12,675	79	47,418
26	4,690	53	13,198	80	50,138
27	4,847	54	13,750	81	53,018
28	5,007	55	14,340	82	56,078
29	5,175	56	14,962	83	59,328
30	5,347	57	15,628	84	62,788
31	5,524	58	16,338		

Таблица XIV

Эквиваленты сырья, вспомогательных материалов, промежуточных продуктов и готовой молочной кислоты

Одна массовая часть соответствует массовым частям	Молекулярная масса	$C_{12}H_{22}O_{11}$	$CH_3CHOH\ COOH$	$(CH_3CHOH\ COO)_2Ca$	$(CH_3CHOH\ COO)_2Ca \times 5H_2O$	CaO	$CaCO_3$
$C_{12}H_{22}O_{11}$	342,3	1	1,052	1,275	1,801	0,328	0,585
$CH_3CHOHCOOH$	90,1	0,951	1	1,212	1,712	0,312	0,556
$(CH_3CHOHCOO)_2Ca$	218,1	0,785	0,825	1	1,413	0,257	0,459
$(CH_3CHOHCOO)_2Ca \cdot 5H_2O$	308,2	0,555	0,584	0,707	1	0,182	0,325
CaO	56,1	3,050	3,208	3,888	5,495	1	1,784
$CaCO_3$	100,1	1,709	1,798	2,179	3,080	0,561	1
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	172,2	0,994	1,045	1,266	1,789	0,326	0,581
H_2SO_4	98,1	1,744	1,835	2,223	3,141	0,572	1,020
$CH_3CHOHCOONa$	112,0	0,764	0,804	0,974	1,376	0,250	0,447
$CH_3CHOHCOOK$	128,1	0,668	0,703	0,851	1,203	0,219	0,391
$CH_3COOHCOONH_4$	107,1	0,799	0,840	1,018	1,439	0,262	0,467
Na_2CO_3	106,0	1,614	1,698	2,058	2,909	0,529	0,944

Продолжение табл. XIV

Одна массовая часть соответствует массовым частям	Молекулярная масса	$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	H_2SO_4	$CH_3CHOH\ COONa$	$CH_3CHOH\ COOK$	$CH_3CHOHCOONH_4$	Na_2CO_3
$C_{12}H_{22}O_{11}$	342,3	1,006	0,573	1,309	1,498	1,252	0,619
$CH_3CHOHCOOH$	90,1	0,957	0,545	1,244	1,424	1,190	0,589
$(CH_3CHOHCOO)_2Ca$	218,1	0,789	0,450	1,027	1,175	0,982	0,486
$(CH_3CHOHCOO)_2Ca \cdot 5H_2O$	308,2	0,559	0,318	0,727	0,831	0,695	0,344
CaO	56,1	3,070	1,749	3,991	4,567	3,819	1,890
$CaCO_3$	100,1	1,720	0,981	2,238	2,560	2,140	1,059
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	172,2	1	0,570	1,301	1,488	1,244	0,615
H_2SO_4	98,1	1,755	1	2,283	2,611	2,183	1,080
$CH_3CHOHCOONa$	112,0	0,769	0,438	1	1,144	0,956	0,473
$CH_3CHOHCOOK$	128,1	0,672	0,383	0,874	1	0,835	0,414
$CH_3COOHCOONH_4$	107,1	0,804	0,458	1,046	1,196	1	0,495
Na_2CO_3	106,0	1,625	0,926	2,113	2,418	2,021	1

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авербух Д. А., Меткин В. П., Чистова Т. Г. Изменение вязкости фильтрата при упаривании. — ХКП, 1972, № 6, с. 19—20.

2. Авербух Д. А., Меткин В. П., Петров Б. М. Определение поверхностного натяжения растворов лимонной кислоты и фильтрата. — ХКП, 1972, № 9, с. 20—22.

3. Авербух Д. А., Меткин В. П., Максименюк М. Н. Вязкость растворов лимонной кислоты и фильтрата.— ХКП, 1973, № 3, с. 21—23.

4. Авербух Д. А., Петров Б. М, Чистова Т. Г. Плотность растворов лимонной кислоты и фильтрата. — ХКП, 1973, № 10, с. 21—22.

5 Алиханян С. И. Селекция промышленных микроорганизмов. — М.: Наука, 1968. — 156 с.

6. Андреев И. И. Скорость роста и растворения кристаллов. — ЖРФ ХО, ч. химич., 1908, т. 40, вып. 3, с. 397—444.

7. Бережной Ю. Д., Новикова Л. А., Старцева Л. И. Использование активированных растворов хлорной извести в качестве дезинфицирующего средства в производстве лимонной кислоты.— ХКП, 1968, № 2, с. 40—42.

8. «Биостим С» — новый премикс для обогащения корма откармливаемых свиней/А. Я. Озолс, А. Р. Вальдман, Р. Я. Карклиньш и др .— В кн.: «Кормовые концентраты лизина». — Рига; Зинатне, 1977. — 178 с.

9. Васильева И. В., Минц Е. С., Мушникова Л. Н. Оценка качества мелассы как сырья для производства лимонной кислоты. — ХКП, 1980, № 4, с. 38—39.

10. Вильнер А. И., Белехов Г. П., Чубинская А. Л. Использование для кормления сельскохозяйственных животных мицелиальной массы гриба A. niger— отхода производства лимонной кислоты. — В сб.: «Кормление сельскохозяйственных животных». — М., 1965, № 6, с. 10—12.

11. Влагопоглощение и сушка лимонной кислоты/Л. О. Осипов, Ф. Э. Ошис, Р. Я. Карклинь и др. — Тр. ВНИИКП, 1966, вып. 17, с. 161—166.

12. Волков Ю. П., Карклинь Р. Я., Раминя Л. О. Изменение азотсодержащих веществ в продуктах биосинтеза лимонной кислоты. — ХКП, 1973, № 6, с. 26—27.

13. Волков Ю. П., Раминя Л. О. Состав азотсодержащих веществ некоторых меласс. — ХКП, 1973, № 10, с. 22—24.

14. Выглазова Е. Г. Характеристика сточных вод производства лимонной кислоты и их очистка. — ХКП, 1972, № 11, с. 24—26.

15. Вязкость растворов винной кислоты/Т. Л. Парфентьева, Г. Я. Рудаков и др. — Пищ. технология, 1977, № 1, с. 157—159.

16. Голубцова В. М. Селекция и культивирование Aspergillus niger в производстве лимонной кислоты. — Автореф. канд. дисс., М., 1979. — 30 с.

17. Горбатая Э. И., Смирнов В. А. Влияние механической очистки мелассы на брожение и съем лимонной кислоты. — Прикл. биохимия и микробиол., 1973, № 3, с. 375—379.

18. Гордиенко В. И., Худякова Л. П. Концентрационные константы диссоциации винной и лимонной кислот при высоких ионных силах — ЖОХ, 1973, в. 2, с. 326—330.

19. Гутенева Л. З., Фесенко Л. Ф., Хомчук Р. Г. Получение лимонной кислоты проточным способом. — В сб.: «Новое в биохимических процессах пищевой промышленности».— Киев: Техника, 1965, вып. 3, с. 73—77.

20. Жаболовская Н. А., Филимонова И. Н. Растворимость производственного цитрата кальция.— ХКП, 1971, № 11, с. 27—29.

21. Жаболовская Н. А., Новотельнова Н. Я., Балыковская Н. В. Изомеризация D-винной кислоты. — ХКП, 1973, № 2, с. 21—23.

22. Журавлева Е. И., Гринфельд Д. Г. Влияние высоты слоя сбра-

живаемого раствора мелассы на интенсивность процесса образования лимонной кислоты грибом Aspergillus niger. — Тр. ВНИИКП, 1958, вып. 12, с. 44—52.

23. Журавлева Е. И. Влияние на лимоннокислое брожение продуктов разложения сахаров, содержащихся в мелассе. — Тр. ВНИИКП, 1958, вып. 12, с. 134—141.

24. Журавский Г. И. Физиолого-биохимические основы производства лимонной кислоты с помощью грибов рода Aspergillus. — Доклад... докт. биолог. наук. — М., 1964. — 48 с.

25. Журавский Г. И., Аглиш И. В. Рост и кислотообразование у Aspergillus niger. Сообщ. V. — Микология и фитопатология, 1974, вып. 1, с. 15—22.

26. Журавский Г. И. Газообмен и образование лимонной кислоты при сбраживании мелассных растворов с помощью Aspergillus niger. — Прикл. биохимия и микробиол., 1976, вып. 3, с. 349—352.

27. Захалев И. А. Кристаллизация виннокаменной кислоты. — Канд. дисс. — Одесса, 1952.

28. Известняк как сырье для производства лимонной кислоты/Н. Я. Новотельнова, Т. Т. Шевцова, Р. А. Юрченко и др. — ХКП, 1981, № 2, с. 36—38.

29. Имшенецкий А. А., Щербакова Е. Я. О корреляции, существующей между морфологическими и физиологическими изменениями у мутантов Aspergillus niger. — Микробиология, 1964, т. XXXIII, вып. 1, с. 252—260.

30. Интенсификация процессов молочнокислого брожения/И. Д. Никулина, Р. Н. Голубчина и др. — Микробиологическая пром-ть, 1979, вып. 5, с. 18—21.

31. Использование отходов производства лимонной кислоты/И. Г. Гома, В. Ф. Федосеев, Т. И. Маслова и др. — ХКП, 1966, № 5, с. 40—42.

32. Использование фильтрата цитрата кальция в кожевенном производстве. — Инф. листок № 1485—76 Ленингр. межотрас. террит. центра научно-техн. инф. и пропаганды.

33. Карклиньш Р. Я., Пробок А. К. Биосинтез органических кислот.— Рига: Зинатне, 1972. — 200 с.

34. Касаткина И. Д. Влияние некоторых аминокислот на рост мутанта Aspergillus niger Т-1 и образование им кислот. — Микробиология, 1961, т. XXX, вып. 3, с. 447—452.

35. Кирсанова В. А. Оптимум pH инвертазы различных штаммов гриба Aspergillus niger. — Биохимия, 1936, вып. 3, с. 386—389.

36. Костычев С. П. Избранные труды по физиологии и биохимии микроорганизмов. Том. 2. — М.: АН СССР, 1956.—508 с.

37. Кристаллизация гипса в процессе разложения цитрата кальция серной кислотой/Н. И. Савченко, И. Г. Гома и др. — ХКП, 1974, № 3, с. 27—28.

38. Кузнецов С. И. Сдвиги окислительно-восстановительных процессов у Aspergillus niger в связи с изменением потенциала среды. — Микробиология, 1932, т. I, вып. 1, с. 30—48.

39. Кузнецова З. Г. Скорость образования молочной кислоты в процессе развития Bacterium delbrückii и использование биомассы для повторного брожения. — Автореф. канд. дисс. — М., 1955. — 26 с.

40. Лозинов А. Б., Финогенова Т. В. Микробиологический синтез органических кислот из углеводородов нефти. — Журн. Всес. хим. о-ва им. Менделеева, 1972, т. 17, № 5, с. 526—532.

41. Маслова Т. И., Смирнов В. А. Экономическая эффективность сбраживания мелассы. — ХКП, 1977, № 12, с. 38.

42. Маслова Т. И., Смирнов В. А. О расходе сахара в процессе лимоннокислой ферментации. — НТРС (конд. пром.), 1978, № 8, с. 11—17.

43. Маслова Т. И., Смирнов В. А. Оптимизация параметров лимоннокислого брожения. — НТРС, серия 3, 1979, вып. 1, с. 6—9.

44. Маслова Т. И., Смирнов В. А. Влияние величины посева A. niger на эффективность лимоннокислого брожения. — НТРС, сер. 3, 1979, вып. 12, с. 12—13.

45. Минц Е. С. Процессы соосаждения при удалении кальция из мелассных растворов. — ХКП, 1976, № 2, с. 25—27.

46. Никулина И. Д. Повышение эффективности молочнокислого брожения, выделения и очистки молочной кислоты. — Автореф. канд. дисс. — М.: 1980. — 30 с.
47. Новотельнова Н. Я. Об условиях кристаллизации виннокаменной кислоты — ХКП, 1970, № 10, с. 17—18
48. Новотельнова Н. Я. Исследование растворимости и кристаллизации лимонной кислоты. — Тр. ЛНИИПП, 1971, т. 1, с. 78—96.
49. Новотельнова Н. Я., Юрченко Р. А., Петрова Л. Ф. Кристаллизация калия кислого виннокислого из производственных растворов винной кислоты.— ХКП, 1978, № 1, с. 30—31.
50. Новотельнова Н. Я., Гайдей Л. А., Юрченко Р. А. Состав сброженных растворов и потери лимонной кислоты.—ХКП, 1978, № 3, с. 36—37.
51. Образование ангидридов в растворах молочной кислоты/И. Д. Никулина, В. А. Смирнов и др —Журн. прикл. химии, 1980, № 5, с. 1109—1115.
52. Ольбрих Г. Меласса. — В кн.: «Принципы технологии сахара». Пер. с англ. — М.: Пищевая промышленность, 1965, с. 218—382.
53. Оценка качества меласс на заводах лимонной кислоты/Д. П. Цибулькова, Л. Н. Мушникова и др. — ХКП, 1978, № 11, с. 38—39.
54. Парфентьева Т. Л., Чернова Н. А. Свойства водных растворов винной кислоты. — Пищ. технология, 1971, № 1, с. 60—63.
55. Патеенко С. К., Смирнов В. А. Влияние полиэтиленимина на кристаллизацию лактата кальция и качество молочной кислоты. — НТРС (конд. пром.), 1978, вып. 6, с. 29—31.
56. Патеенко С. К., Смирнов В. А. Оптимальный режим процесса кристаллизации лактата кальция. — НТРС (конд. пром.), 1978, вып. 2, с. 13—16.
57. Патеенко С. К. Выделение кристаллического лактата кальция из сброженных растворов для выделения молочной кислоты высокого качества.— Автореф. канд. дисс. — М.: 1977. — 17 с.
58. Петрова Л. Ф., Новотельнова Н. Я., Балыковская Н. В. Состав накипи в производстве лимонной кислоты.—ХКП, 1977, № 8, с. 29.
59. Петросян Э. П. Динамическая вязкость растворов мелассы в процессе их подготовки и сбраживания в лимонную кислоту. — Тр. ЛНИИПП, 1971, т. 1, с. 64—67.
60. Предельно допустимые концентрации вредных веществ в воде и воздухе. — Л.: Химия. — 1975. — 455 с.
61. Применение диацетилвиннокислого эфира моноглицеридов/Г. Л. Сичкар, Е. Б. Шишова и др.— ХКП, 1978, № 4, с. 19—20.
62. Производство пищевых кислот/Г. И. Журавский, Л. В. Новоселова, М. И. Елисеев и др. — М.: Пищепромиздат, 1953. — 234 с.
63. Разработка технологической схемы и аппаратурного оформления непрерывного брожения в производстве молочной кислоты/В. Г. Свирида, Е. Л. Клячкина и др. — Тр. БНИИППТ, 1962, вып. 5, с. 40—70.
64. Раминя Л. О. Применение ионного обмена и исследование образования органических кислот в производстве лимонной кислоты. — Автореф. канд. дисс...—Рига, 1963.—24 с.
65. Растворимость лимонной кислоты/Н. Я. Новотельнова, Л. М. Агеев и др. — ХКП, 1968, № 1, с. 21—22.
66. Свирида В. Г., Трулль Л. А., Миланович О. М. Непрерывная кристаллизация лактата кальция под воздействием ультразвука в производстве молочной кислоты. — Тр. БНИИППТ, 1964, вып. 7, с. 3—36.
67. Силин Г. Н. Очистка молочной кислоты ионитами. — Автореф. канд. дисс. — М., 1955. — 24 с.
68. Температурная депрессия и теплоемкость растворов лимоннокислотного производства/С. Н. Богданов, Г. И. Малюгин и др. — Пищ. технология, 1973, № 3, с. 127—129.
69. Терентьева О. Ф. О роли ферроцианида калия в процессах роста и кислотообразования у Aspergillus niger. — Тр. ЛНИИПП, 1971, т. 1, с. 52—63.
70. Терентьева О. Ф. Азотное и минеральное питание Aspergillus niger в зависимости от методов культивирования его в производстве лимонной кислоты. — Автореф. канд. дисс. — Л.: 1971. — 30 с.

71. Технологическая инструкция по производству пищевой лимонной кислоты. — Л.: ЛНИИПП, 1970. — 59 с.

72. Технические требования к гипсовому отходу лимоннокислотного производства при его использовании в цементной промышленности/Л. Ф. Петрова, Н. Я. Новотельнова и др. — НТРС, сер. 3, 1979, № 11, с. 15—17.

73. Фертман Г. И., Исакова Э. А. Использование отходов солодовенного производства. — М.: ЦИНТИпищепром, 1967. — 25 с.

74. Филимонова И. Н., Новотельнова Н. Я. Оценка кормовых свойств фильтрата — отхода производства лимонной кислоты. — ХКП, 1973, № 8, с. 19—20.

75. Филимонова И. Н., Смирнов В. А. Исследование чистоты цитрата кальция в зависимости от состава реакционной массы. — ХКП, 1975, № 12, с. 21—23.

76. Филимонова И. Н., Жаболовская Н. А., Новотельнова Н. Я. Очистка сброженных растворов лимонной кислоты от щавелевой кислоты.— ХКП, 1980, № 1, с. 38—39.

77. Фильтруемость суспензий и величина потерь лимонной кислоты/ Н. Я. Новотельнова, Л. А. Гайдей и др. — ХКП, 1976, № 4, с. 35—36.

78. Цветкова З. Н., Повицкий Н. С. Экстракция лимонной кислоты в три-н-бутилфосфат. — Журн. неорг. химии, 1960, вып. 12, с. 2827—2831.

79. Чернов Г. Н., Москалев Г. Е., Верболова М. И. Микробиологическая промышленность сегодня и завтра (обзор). — Экспр.-инф. Главмикробиопрома, 1976, № 2, с. 13; 1977, № 7, с. 21—25; 1978, № 1, с. 7—25, № 12, с. 25—32; 1979, № 3, с. 25—31.

80. Шапошников В. Н. Основные физико-химические закономерности обмена веществ микроорганизмов. — М.: Наука, 1968. — 124 с.

81. Шевченко В. Б., Ренард Э. В. Экстракция винной, яблочной и молочной кислот в три-н-бутилфосфат. — Журн. неорг. химии, 1963, вып. 2, с. 516—522.

82. Шейман В. А., Залепуга А. С. Гигроскопические свойства некоторых пищевых кристаллических продуктов. — Пищ. технология, 1971, № 3, с. 108—112.

83. Шишацкий Ю. В., Федоров В. А., Наймушина Л. И. Физические характеристики мелассы и мелассных растворов.—ХКП, 1976, № 1, с. 26—28.

84. Щербакова Е. Я. Изменчивость и селекция Aspergillus niger — продуцента лимонной кислоты под влиянием химических мутагенов. — Тр. ЛНИИПП, 1971, т. 1, с. 3—15.

85. Acido citrico. — Comerexter, 1978, n. 7, p. 885—899.

86. Adinolfi A., Moratti R., Olezza S. Control of the citric acid cicle by glyoxylate. — Biochem. J., 1969, n. 3, p. 513—518.

87. Arnold M. Acidulans for food and beverages. London, Food trade press, 1975. — 232 p.

88. Blakebrouch N., Mcnanamey W. Heat transfer to fermentation systems in an airlift fermenter. — Trans. of the Inst. chem. eng., 1978, n. 2, p. 127—135.

89. Brierley M., Steel R. Agitation—aeration in sumberged fermentation. II. — App. microbiol., 1959, 7, p. 57—65.

90. Brin M. Lactic acid—some definitions. — Ann. N—Y. acad. sci., 1965, n. 3, p. 1084—1090.

91. Buchta K. Die biotechnologische Gewinnung von organischen Säuren.— Chemiker Zeitung, 1974, n. 11, s. 532—539.

92. Clark D., Ito K., Horitsu H. Effect of manganese and other heavy metals on submerged citric acid fermentation of molasses. — Biotechnology and bioengineering, 1966, n. 4, p. 465—471.

93. Dokladalova J., Upton R. Effect of carbohydrates on the USP test for readily carbonizable substances. — J. Assoc. of official analytical chemist, 1975, n. 5, p. 1070—1073.

94. Emiliani E., Dawie J. Induced autolisis of Aspergillus. — Appl. microbiol., 1962, 10, p. 504—507.

95. Fischer C. H., Filachione E. M. Properties and reactions of lactic acid. — 1950. Eastern Regional Research Laboratory. Philadelphia.
96. Gärtner M., Šepitka A. Kontrola vyroby kyseliny mliečej. Bratislava. 1962. — 247 s.
97. Habison A., Kubicek C., Röhr M. Phosphofructokinase as a regulatory enzyme in citric acid producing Aspergillus niger. — FEMS — microbiol. Lett., 1979, n. 1, p. 39—42.
98. Hamissa F. A. Effect of alkohols and related compounds on citric acid production from beet molasses by Aspergillus niger. — Chem. Microbiol., Technol., Lebensmittel, 1978, n. 5, S. 157—160.
99. Hanson T. P., Tsao G. T. Kinetic studies of the lactic acid fermentation in batch and continuous cultures. — Biothechnology and bioengineering, 1972, n. 2., p. 233—252.
100. Hastigs J. Development of the fermentation industries in Great Britain. — Advances in applied microbiology, 1971, **14**, p. 1—45.
101. Ilczuk Zd. Genetik der Citronensäuren erzeugenden Stamme Aspergillus niger. I. — Acta mikrobiol. Polon, 1968, 17, s. 331—342; II. — Die Nahrung, 1970, N. 2, S. 97—105; III. — Die Nahrung, 1971, N. 3, S. 251—262; N. 4, S. 381—388.
102. Kovats J., Niestrawski Z. Melasse als Rohstoff der biotechnischen Gewinnung von Zitronensäure. — Branntweinwirtschaft, 1973, n. 16. S. 373—376.
103. Kovats J. Utylizacja produktov odpadwych fermentacji cytrynowej. Přz. ferm., 1969, n. 3, s. 10—12.
104. Kubicek C. P., Röhr M. Influence of manganese on enzyme synthesis and citric acid accumulation in Aspergillus niger. — Eur. J. appl. microbiol., 1977, n. 3, p. 167—175.
105. Kubicek C., Hampel W., Röhr M. Manganese deficiency laends to evalated amino acid pools in citric acid accumulating Aspergillus niger. — Arch. microbiol., 1979, n. 1., p. 73—79.
106. Leopold H., Valtr Z. Zur Wirkung des Kaliumferrocyanids bei der Herstellung von Melasselösungen für die Gitronensäuregärung. 1—8 Mitt., Die Nahrung, 1 Mitt., 1964, N 1, S. 37—49; 3 Mitt., 1965, N 3, S. 335—348; 4 Mitt., 1965, N. 4, S. 346—352; 5 Mitt., 1969, N. 1, S. 11—19; 7 Mitt., 1977, N. 7, S. 627—636; 8 Mitt., 1979, N. 8, S. 655—663.
107. Lockwood L., Yoder D., Zienty M. Lactic acid. — Ann. N—Y. acad. sci., 1965, n. 3, p. 854—867.
108. Luedeking R., Piret E. A kinetic study of the lactic acid fermentation. — J. biochem. and microbiol., technol. and engineering, 1959, n. 4, p. 393—411.
109. Machon V., Fort J. Submerged fermentations with timevariant rheological bath properties. — Biotechnology and bioengineering, 1978, n. 10, p. 1679—1683.
110. Mayrath I. Citric acid producton. — Process biochemistry, 1967, n. 10, p. 25, 27, 56.
111. Messig Wo., Schitz R. Gitronensäure aus Saccharose — ein technisch genutzer Mikrobieller Prozess auf der Basis von Melasse. — Chem. Exp. Didakt., 1976, N 2, S. 309—316.
112. Ramakrischnan S. V., Steel R., Lentz C. Mechanism of citric acid and assimilation in Aspergillus niger. — Arch. Biochem. and biophys., 1955, n. 1, p. 270—275.
113. Schmitz R. Problemlösungen bei der Aufarbeitung von Fermentationlösungen zu reiner Citronensäure. — Chem. Technik, 1977, N 7, S. 255—259.
114. Täufel K., Behnke U. Untersuchungen über Synthese und Abbau von Citronensäure durch Aspergillus niger. — Die Nahrung, 1966, N. 6, S. 444—451.
115. Verhoff F. H., Spradlin J. E. Mass and energy balance analysis of metabolic pathways applied to citric acid production by Aspergillus niger. — Biothechnology and bioengineering, 1976, 43, p. 425—432.

ОГЛАВЛЕНИЕ

В. А. Смирнов

ПИЩЕВЫЕ КИСЛОТЫ

